

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-501190

(P2001-501190A)

(43) 公表日 平成13年1月30日 (2001.1.30)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード\* (参考)

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/48

39/395

39/395

G

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁)

(21) 出願番号 特願平10-514033  
 (86) (22) 出願日 平成9年9月19日 (1997.9.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成11年3月19日 (1999.3.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA97/00698  
 (87) 国際公開番号 WO98/11919  
 (87) 国際公開日 平成10年3月26日 (1998.3.26)  
 (31) 優先権主張番号 60/026, 363  
 (32) 優先日 平成8年9月19日 (1996.9.19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ダイアグノキュア インコーポレイティド  
 カナダ国, ケベック ジー1 ブイ 2 ケー  
 8, サンターフォイ, レネーレベスク プ  
 ールバード ウェスト 2050, スウィックス  
 ス フロア  
 (72) 発明者 ガードロールト, レネ  
 カナダ国, ケベック ジー7 エー 2 エヌ  
 3, パーニエルス, オーピン ロード  
 2120  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

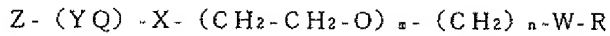
(54) 【発明の名称】 ポリエチレングリコール抱合ナノエリスロソーム、その製造方法及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) であるナノエリスロソームに関する。さらに、本発明はナノエリスロソームの新規の製造方法に関する。さらに、本発明は、免疫原性ポテンシャルの低減を有するナノエリスロソーム組成物に、そして診断及び治療的方法におけるその使用に関する。本発明はさらに、哺乳類における予定症状を診断又は予後判定するための本発明のナノエリスロソーム組成物を用いるバイオアッセイに、並びに本発明のこれらのナノエリスロソーム組成物を含有するキットに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 1. 次式：



(式中、a) Zは、 $YQ=CH=CH$ 又は $-C(R'')=CH_2$ である場合には、 $COOH$ 、 $HO$  (アルデヒド)、 $H$ 、 $OH$  (ヒドロキシル)、 $NH_2$ 、及び $S$ から成る群から選択される一成員であり、あるいは $Y=-C(=O)-$ である場合には、 $H$ 、 $N_3$ 、 $OH$ 、 $CH_3$ 、 $-NH-NH_2$ 、無水物、混合無水物又は活性化エステルでから成る群から選択される一成員であり；

b)  $YQ$ は $CH=CH$ 、 $-C(R'')=CH_2$  (ここで、 $R'=1\sim5$ 個の炭素原子を有する低級アルキル)、塩化シアヌル、ハロゲン化シアン ( $Br$ 又は $Cl$ ) 及びメシル、トシル基を含む $OH$ 活性化剤成る群から選択される一成員であり；

c)  $O(CH_2-CH_2O)_m$ はポリエチレングリコール誘導体であり (この場合、 $m=2\sim500$ ) ；

d)  $W$ は、 $O$ 、 $N$ 、 $S$ 、 $-C(=O)-$ から成る群から選択される一成員である)

のナノエリスロソーム (neryt) -ポリエチレングリコール (PEG) 抱合体。

2.  $Y$ が低級アルキル [ $(CH_2)_n$ ； $n=1\sim7$ ] の群から選択される一成員であり； $Q=-C(=O)$ 、 $N$ 、 $S$ である

請求項1のナノエリスロソーム (neryt) -ポリエチレングリコール (PEG) 抱合体。

3.  $W=-O-$ であり、 $R$ は： $H$ 、 $1\sim7$ 個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-R$  (ここで、 $R$

はポリアミン誘導体、例えばスベルミン、スベルミジン又はプトレseinである) から成る群から選択される一成員である

請求項1又は2のナノエリスロソーム (neryt) -ポリエチレングリコール (PEG) 抱合体。

4.  $W = -N-$ であり、RがH、1～7個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-C(=O)-R$ （ここで、Rはスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである）、1個又は2個の $COOH$ 、 $SO_3H$ 又は $PO_4$ 基を保有する1～6個の炭素原子の低級アルキルから成る群から選択される一成員である

請求項1又は2のナノエリスロソーム(nEryt)-ポリエチレングリコール(PEG)抱合体。

5.  $W = -S-$ であり、RはH、1～7個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-C(=O)-R$ （ここで、Rはスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである）から成る群から選択される一成員である

請求項1又は2のナノエリスロソーム(nEryt)-ポリエチレングリコール(PEG)抱合体。

6.  $W = -C(=O)-$ であり、RはH、1～7個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-O-$ 、 $-C(=O)-R$ （ここで、Rはスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである）から成る群から選択される一成員である

請求項1又は2のナノエリスロソーム(nEryt)-ポリエチレングリコール(PEG)抱合体。

7. WRは、 $COOH$ 、 $PO_4$ 、 $SO_3H$ から成る群から選択される一成員である

請求項1又は2のナノエリスロソーム(nEryt)-ポリエチレングリコール(PEG)抱合体。

8. YQが塩化シアヌルであり、 $(CH_2-CH_2O)_n$ が約350～約10,000の分子量を有し、そして $-(CH_2)_n=CH_3$ である請求項1のnEryt-PEG抱合体。

9. YQが塩化シアヌルであり、 $(CH_2-CH_2O)_n$ が約1,000～約7,000の分子量を有し、そして $-(CH_2)_n=CH_3$ である請求項8のnEr

y t-PEG抱合体。

10. YQが塩化シアヌルであり、 $(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n$ が約2,000～約5,000の分子量を有し、そして $-(\text{CH}_2)_n=\text{CH}_3$ である請求項8のn E r y t-PEG抱合体。

11. YQZが $(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ 、 $(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_m$  ( $m=7$ )、 $-(\text{CH}_2)_n$  ( $n=1$ )、 $(\text{CH}_3)$ 、 $(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$ 、 $(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n$ 、 $(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$ 、 $(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n$ 及び $(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n$ から成る群から選択される請求項1のn E r y t-PEG抱合体。

12. YQがシアヌルクロリド誘導体、アルデヒド、スクシンイミド、スクシンイミドベンズイミダゾール、対称ジスルフィド及びヘテロ二官能性PEGから選択され、そして $(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n$ が約350～10,000の分子量を有し、 $-(\text{CH}_2)_n=\text{CH}_3$ である請求項1のn E r y t-PEG抱合体。

13. 前記n E r y tが抗体又はその一部と結合し、抗体又はその一部が前記ナノエリスロソームを抗体又はその一部により認識される抗原に対する標的にするn E r y t-配位子組成物。

14. 前記ナノエリスロソームに抱合されるPEG誘導体を包含する、免疫原性ポテンシャルの有意の低減を有するナノエリスロソーム組成物。

15. 哺乳類からの赤血球からのナノエリスロソームの製造方法であって、二価および/または三価陽イオンを含有しない低張水性緩衝液、pH8～1を用いて、適切なクロマトグラフィーゲルを含有するカラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーを包含する方法。

## 【発明の詳細な説明】

ポリエチレングリコール抱合ナノエリスロソーム、その製造方法及びその使用  
産業上の利用分野

本発明は、ドラッグデリバリーシステム（DDS）であるナノエリスロソームに関する。さらに、本発明はナノエリスロソームの新規の製造方法に関する。さらに、本発明は、免疫原性ポテンシャルの低減を有するナノエリスロソーム組成物に、そして診断及び治療方法におけるその使用に関する。本発明はさらに、哺乳類における予定症状を診断又は予後判定するための本発明のナノエリスロソーム組成物を用いるバイオアッセイに、並びに本発明のこれらのナノエリスロソーム組成物を含有するキットに関する。

## 発明の背景

ナノエリスロソーム（neryt）は、その含有ヘモグロビンを除去するため、低塩溶液中で処理される赤血球から産生される小胞である。その後、これらのヘモグロビン無含有赤血球（ゴースト）は押し出されて（真空濾過を邪魔する）、約100nmの平均直径を有する小胞を形成する（米国特許第5,653,999号）。ナノエリスロソームは本質的に、リボソームから類推して、リボプロテオソーム（脂質とタンパク質とで構成される小胞）と考えられる。にもかかわらず、それらは、ほとんど専ら脂質ベースのリボソームと比較して、全体的に別個の科学領域を示す。ナノエリスロソームは、表面对容積比が高い（親赤血球の約80倍）ために長期間懸濁液中に残存する浮揚性小胞である。ナノエリスロソームは、種々

の種類分子、例えば血流を通して種々の標的に運搬される薬物又はペプチドを保有し得る。それらは例えば、細胞への選択的供給のために抗体又はペプチド配位子に結合される。さらに、ナノエリスロソームは生物学的関連物質を被包し得るか、あるいは生物学的関連分子がそれに結合される。したがって、ナノエリスロソームは非常に多面的な生物活性薬物担体又はドラッグデリバリーシステム（DDS）である。

ナノエリスロソームは、その他のDDSを上回る利点を有することが示されて

おり、生物薬理学における突破口を形成し得る。例えば、多数の薬物は、長期間、その血中濃度を最適治療レベルに保持するために、繰り返し投与されねばならない。そうするために、アルブミンミクロスフェア、アクリルミクロスフェア、リポソーム、磁性ポリマー、レクチン及びmAbといったようないくつかの方法が今日試験中である。これらの技術はほとんどが、未だ開発中であり、その用途は、多かれ少なかれ、抗新生物薬といったような特定の製品群に、および／または標的器官、例えば肝臓又は脾臓に限定される。これらの薬物担体のいくつかを用いて得られた結果は有望であるけれども、それらの担体を構成する物質はしばしば、免疫系により異物又はハプテンと認識され、その結果、それらについては有害な免疫学的反応を誘発する。

さらに、これらの担体のいくつかは肝臓又は腎臓に迅速に捕獲され、破壊される。すると薬物がそれらの器官中に直接、高濃度で遊離され、しばしば、毒性作用をもたらす。

ナノエリスロソームの利点としては：1) それらは、肝臓又は腎臓を経てそれらの排泄を防止することによりそれらが運搬する薬物の代謝を有意に修飾し；2) 多数の生物学的関連分子又は生物活性物質を被包又は結合することができ；3) 数種類の分子、例えば抗

新生物薬、光線療法薬及びペプチドのための漸進性薬物放出システムとして用いて、長期間、血流中の薬物の最適濃度を保持し；そして4) 血流中への大量の薬物の高用量即時投与の必要性を低減し、それにより高血中濃度の有毒薬物により引き起こされる悪心及び嘔吐といった有害作用を低減し得る、ということが挙げられる（米国特許第5,653,999号）。

しかしながら、ナノエリスロソームは、他の担体と比較して低レベルにはあるが、しかし哺乳類の免疫反応を依然として引き出し得る。さらに、それらは胃液により破壊され、したがって経口投与用には非修飾形態では有効に用い得ない。

ナノエリスロソームは、本来、脂質とタンパク質とで構成される。ナノエリスロソーム（neryt）中のタンパク質及び脂質、例えばホスファチジルセリン

の存在は、非自系用途に用いる場合（哺乳類は、自系投与と対照したものとして別の非適合性哺乳類からのナノエリスロソームを受容しており、それにより血液ドナー及びレシピエントは同一であるか、又は少なくともドナーとレシピエントは適合性である）、レシピエント哺乳類の免疫学的反応を引き起こす。それらの望ましくないタンパク質-タンパク質相互作用は、ナノエリスロソームを基礎にした治療的、診断的及び商業的用途に関する可能性を重度に制限し得る。例えば治療的用途では、ナノエリスロソームは有害免疫反応を誘発する。さらに、診断用途に用いる場合には、それらは高バックグラウンドに関与する。したがって、その望ましくない反応を妨げる戦略を見出す必要は依然として存在する。さらに、低pH条件で（例えば胃のような）より安定なnEryt組成物を提供する必要も依然として存在する。

タンパク質の免疫原性を低減するためのポリエチレングリコール（PEG）の使用は、過去に報告されており、当業界で十分公知で

ある（米国特許第5,595,732号）。リポソームをコーティングするためのPEGの使用も報告されている（米国特許第5,593,622号及び米国特許第5,620,689号）。しかしながら、ナノエリスロソームが崩壊を伴わずにPEG結合に耐え得るか否か、あるいはそれらがその生物学的活性を保持し得るか否かは、未だ確定されていない。したがって、免疫学的ポテンシャルは低減しているが、しかしドラッグデリバリーシステムとしてのその生物学的活性は保持するナノエリスロソーム組成物を提供する必要は、依然としてある。

DDSを抗体により認識される特定部位に対する特異的標的とするための、抗体のドラッグデリバリーシステムとの結合が報告されている。例えば、米国特許第5,620,689号は、CD-19抗体結合リポソームを教示する。抗体のnErytとの結合がnErytの完全性を保持するか否かは、今までのところ確定されていない。

したがって、そこに抱合する配位子により細胞又は組織に対して特異的に標的とされるnEryt組成物を提供する必要が、依然としてある。

本発明は、これらのそしてその他の必要を満たそうと試みる。

本発明の説明は多数の実例を示すが、その記載内容は参照により本明細書に含まれる。

#### 発明の要約

本発明は、診断的又は治療的道具としてのナノエリスロソームに関する。さらに本発明は、配位子に特異的な受容体、例えば抗原（抗体により認識される）に対するナノエリスロソームのターゲッティングを可能にするために、配位子、例えば抗体又はその一部に結

合されたナノエリスロソームに関する。生物学的関連物質をこのようなナノエリスロソームにさらに結合することにより、あるいはナノエリスロソームと結合した配位子中に生物学的関連物質を被包することにより、ナノエリスロソームに結合した配位子により認識される受容体に対する生物学的関連物質のターゲッティングがここで可能になる。一実施態様において、本発明は癌抗原 gp54/TR O P-2 を認識する抗体と結合したナノエリスロソームを包含する n E r y t 組成物、即ち生物活性薬を被包する抗体結合ナノエリスロソームに関する。特定の実施態様では、抗体結合抗体は蛍光色素を被包する。特定の好ましい実施態様では、n E r y t を結合する抗体は、抗癌分子を被包する。

本発明はさらに、このような配位子結合ナノエリスロソームおよび/または生物学的関連物質を被包する配位子結合ナノエリスロソームの製造方法に関する。

特定の実施態様では、本発明は生物学的関連又は生物活性物質を被包する又は被包しない抗体結合 n E r y t 組成物の製造方法に関する。

本発明はさらに、抗体又はその一部と結合するナノエリスロソームを包含する複合体であって、抗体又はその一部が、抗体又はその一部により認識される抗原に対してナノエリスロソームを標的にする複合体に関する。

さらに、本発明は、熱衝撃のサイクルから成る、ナノエリスロソーム中に生物学的関連物質を被包する方法に関する。一実施態様では、被包又は捕獲方法は、氷、ドライアイス又はその他の寒剤（例えば、氷-塩化ナトリウム（約-20℃）、アセトン-ドライアイス（-78℃））上での、好ましくは液体窒素中での凍結融解のサイクルを包含する。



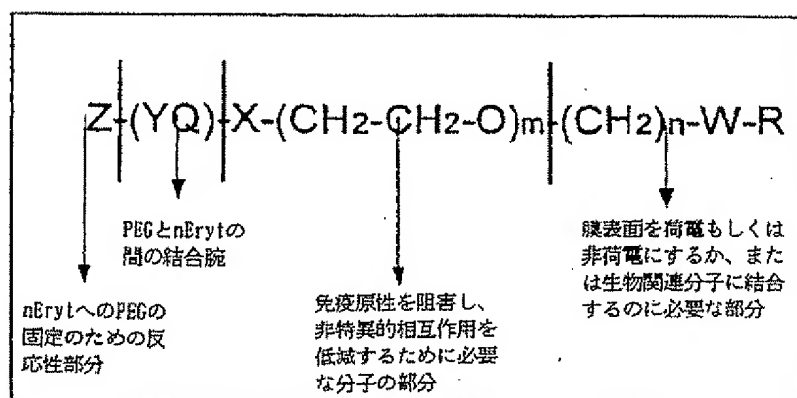
本発明はさらに、免疫原性ポテンシャルを有意に低減されたナノエリスロソーム組成物に関する。さらに、本発明はnEryt-PEG組成物に関する。

さらに本発明は、経口投与され得るnEryt組成物に関する。さらに、本発明は、経口投与され得るPEG-nEryt組成物に関する。




本発明の好ましい実施態様が特異的抗体に関して、並びに特異的生物学的相关物質に関して実証される場合でも、本発明の方法は抗体又はその一部を含めた多数の種類の配位子の結合に適応され得ると、当業者は認識するため、本発明はそれだけに限定されない。したがって、「配位子」という用語は、受容体に対する高親和性を有する物質と、広義に解釈されるべきである。多数の種類の配位子が当業者に十分公知である。同様に、多数の異なる生物学的相关物質が、本発明のナノエリスロソーム中に被包され、および／または本発明のナノエリスロソームと結合し得る。

意外にも、ポリエチレングリコール誘導体の抱合は、nEryt小胞の生物学的相关性を阻害することなくnErytの免疫原性ポテンシャルを低減するのに有用である、ということが判明した。前に述べたように多数の出版物及び特許がタンパク質又はリポソームに結合するPEGの論題に関して存在するが、しかし本出願は先ず、nEryt小胞の完全性を有意に危うくせずにナノエリスロソームがPEGと結合し得る、ということを示す。nEryt-PEG結合技術は、多数のパラメーターが関係するため、開発するのが困難であったことを指摘しなければならない。

nEryt-PEG結合の努力の複雑さにしたがって枠組みの設定に役立てるために、PEGの以下の一般式及びその説明を示す。



「Z」は、PEGとnEryt膜中に存在するタンパク質との抱合に参与する基である。その反応基の組成物は、利用可能な反応基、例えばアミノ基、例えばリシン残基とのPEG抱合の動力学的制御のために非常に重要である。i) 活性化エステル、例えばスクシ

ンイミド (  ) エステルにより例示されるNH<sub>2</sub>基 (即ち、リシン残基) ; 及び ii) マレイミド (  )、2-チオピリジル (  ) 誘導体及びジスルフィド基により例示される

SH基 (即ち、システイン残基又はリシンのイミノチオラン誘導体) のために、タンパク質上に存在する2つの族の求核性試薬をターゲティングする2種類の反応基が用いられた。nEryt膜は、当業者により、公知の方法で修飾されて、PEG又はその他の物質を抱合する相手として役立ち得る反応基を提供および/または修飾する。

好ましい実施態様では、Zは、 $YQ=CH=CH$ 又は $-C(R'')=CH_2$ である場合には、 $COOH$ 、 $HO$  (アルデヒド)、 $H$ 、 $OH$  (ヒドロキシル)、 $NH_2$ 、 $SH$ から成る群から選択される一成員である。Yは $-C(=O)-$ である場合、Z=H、 $N_3$ 、 $OH$ 、 $CH_3$ 、 $-NH-NH_2$ 、無水物、混合無水物又は「活性化エス

テル」であって、これは当業者に公知であり、M. Bodansky (「Principles of p

peptides synthesis:chapter II, Activation and coupling」Haftner et al., 1984, Eds. Springer-Verlag, New York. Pp9-52) により例示されている。

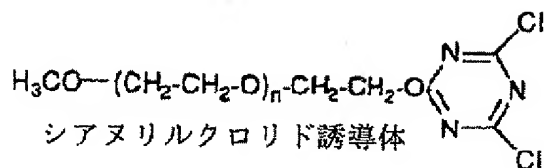
PEGをn E r y t に結合するのに有用な活性化基のいくつかの例を以下に示す：

臭化シアン (BrCN)、脱アミノ酸エステル (Zalipsky et al., 1984, 「J. Macromol. Sci. Chem. 」 A21:8339;Mutter et al., 1979, 「The Peptides」 Gross et al., eds., 2, p.285, Academic Press, New York)、ヒドラジン誘導体 (Rubinstein, 1978, 米国特許第4, 101, 380号; Davis et al., 1979, 米国特許第4, 179, 337号及びPersson et al., 1988, 「J. Chromatog」 457:183)、炭酸スクシンイミダジル誘導体 (Miron et al., 1993, 「Bioconjugate Chem」 4:568;Zalipsky et al., 1993, 「Bioconjugate Chem. 」 4:296及びZalipsky et al., 1991, 「Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems」 Dunn et al., 編., ACS, Washington, DC)、オキシカルボニルイミダゾール誘導体 (Allen et al., 1991, 「Biochem. Biophys. Acta」 1066:29;及びTondelli et al., 1985, 「J. Controlled Release」 1:25)、炭酸ニトロフェニル誘導体 (Satore et al., 1991, 「Appl. Biochem. Biotech. 」 27:45)、トレシレート誘導体 (Klibanov et al., 1991, 「Biochem. Biophys. Acta」 1062:142;Delgado et al., 1990, 「Biotech. Appl. Biochem. 」 12:119)、マレイミド誘導体 (Kogan, 1992, 「Synthetic Commun. 」 22:2417及びRomani et al., 1984, 「Chemistry of Peptides and Proteins」 Volter et la., 編. 2, p29, Walter de Gruyter, Berlin)。

分子の「YQ」部分は、PEGのタンパク質との抱合を可能にす

る結合腕である。YQとして用いられる基は、好ましくは  $(CH_2)_n$  (式中、 $n = 1 \sim 8$  個の炭素原子、好ましくは  $2 \sim 5$  個の炭素原子) から成る。特定の  $n$  の使用は、所望の特定のn E r y t-PEG組成物及びその使用によって、当業者には容易に適応され得る。概して、 $n$  は8より大きく、分子は過脂質可溶性である傾向がある。YQ基は、ポリエチレングリコールのOH基をタンパク質に直接抱合するには非常に少数の方法しかないために、重大な基である。1つの例外は

、予備実験で用いられたシアヌリルクロリド誘導体である。



好ましい実施態様では、YQは： $\text{CH}=\text{CH}$ 、 $-\text{C}(\text{R}'')=\text{CH}_2$ （ここで、 $\text{R}''$ は1～5個の炭素原子を有する低級アルキルである）、塩化シアヌル、ハロゲン化シアン（Br又はCl）及びその他のOH「活性化剤」、例えばメシル、トシル基から成る群から選択される一成員である。Yが低級アルキル〔 $(\text{CH}_2)_n$ ； $n=1\sim7$ 〕の群から選択される一成員である場合には； $\text{Q}=-\text{C}=(\text{O})$ 、N、Sである。

「X」原子は、酸素（エーテル）、硫黄（チオエーテル）原子、又は $-\text{O}-\text{C}(\text{O})$ （エステル）、 $-\text{N}-\text{C}(\text{O})$ （アミド）及び $-\text{S}-\text{C}(\text{O})$ （チオエステル）である。チオアルキル、アルコキシ結合及びアミド生物学的に安定であるが、しかしながら、エステル及びチオエステル結合は、それらが多少迅速な動力学を用いて生物学的媒質中で加水分解されるため、非常に不安定である。加水分解動力学は、YQ部分の長さに関連する。しかしながら、それらは

、徐放装置として用いられるnerytの設計に非常に有用であると立証される。nerytと生物学的関連分子又は生物活性剤との間の結合が安定であるか不安定であるかは、当業者により確定される。概して、安定結合が好ましいけれども、不安定結合に関する実用性の例としては、neryt組成物を特定位置に標的化した後に、nerytの食食作用がそれをPEG分子に連結する結合の破壊により免疫原性にする、そしておそらくはマクロファージにより生物活性剤を被包するのが望ましい状況が挙げられるが、これに限定されない。

分子の $(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m$ 部分は、ポリエチレングリコールそれ自体である。mは、1～500のいずれかである。したがって、350～10,000の分子量、好ましくは1,000～10,000、さらに好ましくは2,000～5,000の分子量を有するPEGが用いられる。

最後に、 $[(CH_2)_n-W-R]$  基は、 $nEryt$  周囲の媒質に面する。この基の性質が本発明の用途にとって決定的であることは明らかである。例えば、 $(CH_2)_n-W-R$  は、 $nEryt$  が簡単な担体 (DNA ワクチン) として、又は粘膜 (肺、小腸) を介した吸収のために包含される用途においては、免疫反応を妨げるために、好ましくは不活性基、例えば  $OCH_3$  ( $WR$ ) であるべきである。しかしながら、電場 (マイクロチップ) における  $nEryt$  の特異的置換を要する診断用途に関しては、 $(CH_2)_n-W-R$  は正電荷 (即ち、 $-NH_2$ ) 又は負電荷 (即ち、 $-COOH$ ) 荷電基でなければならない。 $(CH_2)_n-W-R$  はさらに、ポリエチレングリコール誘導体が生物学的関連分子、例えば抗体を細胞又は特定の器官を標的にするために結合し、その一方で  $nEryt$  の固有の免疫原性を阻害するのに必要とされる場合には、 $SH$ 、 $2$ -チ

オピリジル又はマレイミドのような基である。前記の点から見て、 $[(CH_2)_n-W-R]$  基の性質は特定の用途又は使用の特別な必要性を満たすよう適応される、ということは、当業者には容易に明らかになる。好ましくは、 $n=1\sim7$  個の炭素原子である。

$W$  は、 $O$ 、 $N$ 、 $S$ 、 $-C(=O)$  から成る群から選択される一成員である。

$W=-O-$  である場合、 $R$  は： $H$ 、 $1\sim7$  個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-R$  (ここで、 $R$  はポリアミン誘導体、例えばスベルミン、スベルミジン又はプトレセインである) から成る群から選択される一成員である。

$W=-N-$  である場合には、 $R$  は： $H$ 、 $1\sim7$  個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-C(=O)-R$  (ここで、 $R$  はスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである)、 $1$  個又は  $2$  個の  $COOH$ 、 $SO_3H$  又は  $PO_4$  基を保有する  $1\sim6$  個の炭素原子の低級アルキルから成る群から選択される一成員である。

$W=-S-$  である場合、 $R$  は： $H$ 、 $1\sim7$  個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-C(=O)-R$  (ここで、 $R$  はスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである) から成る群か

ら選択される一成員である。

$W = -C(=O)-$ である場合、 $R$ は： $H$ 、1～7個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-R$ （ここで、 $R$ はスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである）から成る群から選択される一成員である。

$WR$ は、 $COOH$ 、 $PO_4$ 、 $SO_3H$ から成る群から選択される一成員である。

$nEryt$ 修飾の状況で用いられるPEGの選択が複雑であるということは、前記から明らかである。さらに、修飾PEGを $nEryt$ と反応させた場合、最も重要なその他のパラメーターが考慮されねばならないが、その一例としては、膜上に存在する利用可能な反応基（即ち、 $NH_2$ および／または $SH$ 基）の数に関連したPEG置換のパーセンテージが挙げられる。置換が多すぎると、 $nEryt$ はそれ自体で崩壊するか、又は $nEryt$ による生物活性剤の捕獲又は抱合といったようなさらなる仕事の役に立たなくなる。逆に、置換が少なすぎると、 $nEryt$ も免疫原性のまま（治療的用途では有害と確定され得る）であるか、又は標的に対して担体を非特異性にする（診断的相互作用において望ましくない）望ましくない種々の種類の相互作用に対して保護されない。PEGにより置換される $nEryt$ 膜上の反応基（即ち、 $SH$ 又は $NH_2$ ）のパーセンテージは、ここで本発明を認識した当業者により容易に適応され得る。好ましくは、 $nEryt$ の膜の反応基の2～30%が、さらに好ましくは2～15%がPEGで置換される。

$nEryt$ は、種々の哺乳類供給源（マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒト等）からの血液から調製される。血液は、抗凝固薬（ヘパリン、EDTA、クエン酸塩等）上に収集される。本発明の一実施態様によれば、血液を遠心分離し、血漿及びバッフィーコートを除く。圧縮された赤血球をリン酸緩衝液（PBS：150mM NaCl、5.0mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ 、pH 7.4）中に再懸濁して、血液の初期容積にする。赤血球を4回洗浄し、 $2 \times 10^9$ 細胞/mlの濃度で再懸濁する。

懸濁液中の赤血球は、過去に米国特許第5,653,999号に記載されてい

るように、そのヘモグロビンを枯渇させ得る。しかしながら、本発明は、ゴースト調製のさらに有効で、定量的で、簡単

で且つ容易に軽量可能な方法を提供する。それにより、懸濁液中の赤血球は、Wood (1987, 「Methods in Enzymol.」 149:271-280及び米国特許第5, 653, 999号)の従来のプロトコルに関しては有意の修飾である二および/または三価陽イオンを用いずに、低張(2~5 mM)水性緩衝液, pH 8~11を用いて、高分解能を有する適切なクロマトグラフィー用ゲルであるセファロースCL 6B又はセファクリルS 400を含有するカラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーにより、そのヘモグロビンを枯渇される。赤血球からのホワイトゴーストの回収は、ほぼ定量的である。

次の製造工程は、米国特許第5, 653, 999号と比較して、ナノエリスロソームの製造方法の有意の修飾を提供しつつある。ホワイトゴーストの低張懸濁液のpHを7.4に持っていくことは、本発明の方法における低張条件及び陽イオンの非存在の本質的役割を指示するには重要である。これらの要件に応じることができなければ、nErytの製造は全体的に危うくなる。懸濁液を、約0.45  $\mu$ mのフィルターに通して濾過し、その直後に約0.22  $\mu$ mのフィルターに通して濾過する。特に、本発明の方法では、押出しを用いない。さらに、1  $\mu$ mフィルターを通す多重押出しは必要でない。実際、フィルターを通してゴーストを押し出すために懸濁液に圧力を掛ける代わりに、それぞれ約0.45及び0.22  $\mu$ mの2つのフィルター(即ちテフロン)を通して懸濁液を真空濾過させる。nErytの回収率もほぼ定量的である。最大10%のnErytが失われるので、好ましくは5%未満とする。米国特許第5, 653, 999号の方法を用いた場合、20%又はそれより多くのnErytが失われる。操作はすべて、好ましくは滅菌条件下で実行する。

当業者には一般的に公知のいくつかの手段により、例えば i) 水

性溶液の又はトレハロース、スクロース勾配での遠心分離(即ち、20,000 x 20分); ii) 分子量200,000~1 x 10<sup>6</sup>の切断片を用いた酢酸セ

ルロース管中での透析；i i i) アミコン (Amicon) 系を用いた濃縮；i v) トレハロース、スクロース又はラフィノース溶液を用いた凍結乾燥 (n E r y t [タンパク質] の糖のmg比は1~100:1である) により、希釈懸濁液 (10<sup>12</sup> n E r y t / ml) を濃縮する。これらの技術は、未修飾 n E r y t、そこに閉じ込められた生物活性剤を有する n E r y t、そこに共有結合された生物活性剤を有する n E r y t、並びにそこに閉じ込められた生物活性剤を有し且つそこに共有結合された生物活性剤を有する n E r y t に適用可能である。

本明細書中で用いる場合、「被包された」「閉じ込められた」及び「捕獲」という用語は、生物活性剤に関する場合には、「処理」後に生物活性剤が特定のどこに置かれたかを査定するのが非常に難しいので、広範に定義される。実際、生物活性剤が n E r y t の内側にあるのか膜に深く結合しているのかを査定するのは困難である。それでも、実験 (即ち、DNA を用いて) は、DNA が分解しないよう保護されていることを実証するため (下記参照)、生物活性剤は n E r y t に閉じ込められる／捕獲されると考えられる。


閉じ込め／捕獲手順は簡単である：n E r y t を、閉じ込められる生物活性剤の考え得る最高濃度を含有する陽イオン無含有溶液 (二価および／または三価) である低張又は等張溶液中に懸濁する。分子の捕獲は、室温で低速で起こる。好ましくは、n E r y t - 生物活性剤溶液を急速冷凍し、室温に暖めることにより、より効率よく、迅速に実行される。当業者に十分公知の凍結氷、ドライアイス又はその他の寒剤上に、n E r y t - 生物活性剤溶液を置く。寒剤の例としては、氷-塩化ナトリウム (約-20℃)、アセトン-ドラ

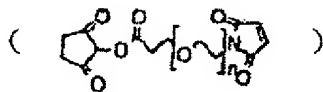
イアイス (約-78℃) 等が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、寒剤は液体窒素である。次に遊離生物活性剤を、その化学的性質により適用される種々の方法 (遠心分離-洗浄サイクル、排除クロマトグラフィー、透析等)、そして当業者に適応可能な種々の方法により、捕獲されたものから分離させる。捕獲分子を有する n E r y t は、濃縮される (凍結乾燥) か、又はその後の工程、例えばその膜表面への P E G、配位子、抗体の抱合に用いられる。懸濁液中に二価および／または三価の陽イオン、例えば Mg、Mn、Zn、Ca 等が存在



しないようにすることは、最も重要なことである。このような陽イオンが存在するとnErytの膜が閉ざされ、したがって生物活性剤の捕獲がほとんどの場合に低減される。nEryt膜上の二価および/または三価陽イオンのこの「封止」特性が、nErytにおける生物活性剤捕獲の漏洩をさらに低減するために、ある条件下で有益に用いられるということは、当業者には認識される。捕獲拡散配列を有するこの種の封止nErytも、本発明の範囲内である。

種々の生物学的に重要な分子、例えば抗体を含めた配位子、及びポリエチレングリコール又は化学的改質剤、例えばイミノチオランは、ここで、nErytの膜表面に抱合される。診断的用途の好ましい実施態様では、モノクローナル抗体、例えば48-127及びM344がnErytに抱合され得る。抗体は、nEryt膜上のリシン残基に存在する-NH<sub>2</sub>基、又はシステイン残基の-SH基を用いて、前記のように抱合され得る。抱合は、ヘテロ二官能価結

合剤、例えば、SMCC (  ) 又は下記の一般式



(式中、n=2~100)のヘテロ二官能価PEGを用いる多数の技法により起り得る。

前記のように、nErytの化学的性質は膜中に存在するタンパク質の修飾を可能にする。例えば、i) イミノチオランはSH基を膜に付加し得る。その反応は、求電子性基、例えばマレイミドを用いてPEG又は抗体を抱合させる(例えば、SMCC及びヘテロ二官能価PEG)。ii) 例えば、無水物、例えばコハク酸、シスアコニチン酸、シトラコン酸無水物のnErytへの付加は、表面に負の電荷をもたらす-COOH基を付加する。これは、結合nErytからの未結合nErytの分離を実施するために電場の使用を必要とする診断的用途に有用である。iii) 例えば、ポリアミン誘導体、例えばスperlミン、プトレシン、スperlミジン又はポリリシン誘導体のnErytへの付加は、結合nErytからの未結合nErytの分離を実施するために電場の使用を必要とする診断的用途に有用である表面に負電荷をもたらす-NH<sub>2</sub>基を付加する。このような化

学的作用は、 $R_2$ 基（ここで、 $R_2 = -COOH$ 、 $PO_4^{2-}$ 、 $SO_3H$ 、 $NH_2$ ）を有するか、又は多価陰イオン又は多価カチオン分子、例えばスベルミン、ヘパリン等で置換されるPEGを抱合することにより可能である（PEGの一般式参照）。

概して、本発明のポリエチレングリコール誘導体は、以下の一般式により示される：



（式中、YQは $CH=CH$ 、 $-C(R'')=CH_2$ （ここで、 $R' = 1 \sim 5$ 個の炭素原子を有する低級アルキル）、塩化シアヌル、ハロゲン化シアン（Br又はCl）及びその他のOH「活性化剤」、例えばメシル、トシル基から成る群から選択される一成員である。

Yが低級アルキル〔 $(CH_2)_n$ ； $n = 1 \sim 7$ 〕の群から選択される一成員である場合には； $Q = -C = (O)$ 、N、Sであり；

Zは、 $YQ = CH=CH$ 又は $-C(R'')=CH_2$ である場合には、 $COOH$ 、 $HO$ （アルデヒド）、 $H$ 、 $OH$ （ヒドロキシル）、 $NH_2$ 、 $SH$ から成る群から選択される一成員である。Y $=-C = (O)-$ である場合、 $Z = H$ 、 $N_3$ 、 $OH$ 、 $CH_3$ 、 $-NH-NH_2$ 、無水物、混合無水物又は「活性化エステル」であって、これは当業者に公知であり、M. Bodansky（「Principles of peptides synthesis:chapter II, Activation and coupling」Haftner et al., 1984, 編・Springer-Verlag, New York. Pp9-52）により例示されている）；

PEGをn E r y tに結合するのに有用な活性化基のいくつかの例を以下に示す：臭化シアン（BrCN）、脱アミノ酸エステル（Zalipsky et al., 1984, 「J. Macromol. Sci. Chem.」A21:8339;Mutter et al., 1979, 「The Peptides」Gross et al., 編., 2, p.285, Academic Press, New York）、ヒドラジン誘導体（Rubinstein, 1978, 米国特許第4, 101, 380号；Davis et al., 1979, 米国特許第4, 179, 337号及びPersson et al., 1988, 「J. Chromatog.」457:183）、炭酸スクシンイミダジル誘導体（Miron et al., 1993, 「Bioconjugate Chem.」4:568;Zalipsky et al., 1993, 「Bioconjugate Chem.」4:2

96及びZalipsky et al., 1991, 「Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems」Dunn et al., 編., ACS, Washington, DC)、オキシカルボニルイミジダゾール誘導体 (Allen et al., 1991 「Biochem. Biophys. Acta」1066:29;及びTondelli et al., 1985, 「J. Controlled Release」1:25)、炭酸ニトロフェニル誘導体 (Satore et al., 1991, 「Appl. Biochem. Biotech.」27:45)、トレシレート誘導体 (Klibanov et al.,

1991, 「Biochem. Biophys. Acta」1062:142; Delgado et al., 1990, 「Biotech. Appl. Biochem.」12:119)、マレイミド誘導体 (Kogan, 1992, 「Synthetic Commun.」22:2417及びRomani et al., 1984, 「Chemistry of Peptides and Proteins」Volter et al., 編. 2. p29, Walter de Gruyter, Berlin) ;

$O(CH_2-CH_2O)_m$  はポリエチレングリコールであり (この場合、 $m = 2 \sim 500$ ) ;

$n = 1 \sim 7$  炭素原子 ;

Wは、O、N、S、 $-C(=O)$  から成る群から選択される一成員であり ;

W= $-O-$ である場合、Rは : H、1~7個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-R$  (ここで、Rはポリアミン誘導体、例えばスベルミン、スベルミジン又はプトレセインである) から成る群から選択される一成員であり ;

W= $-N-$ である場合には、Rは : H、1~7個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-C(=O)-R$  (ここで、Rはスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである)、1個又は2個の $COOH$ 、 $SO_3H$ 又は $PO_4$ 基を保有する1~6個の炭素原子の低級アルキルから成る群から選択される一成員であり ;

W= $-S-$ である場合、Rは : H、1~7個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-C(=O)-R$  (ここで、Rはスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである) から成る群から選択される一成員であり ;

$W = -C(=O)-$ である場合、 $R$ は： $H$ 、1～7個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-R$

(ここで、 $R$ はスperlミン、スperlミジン又はプトレseinから得られるポリアミンである) から成る群から選択される一成員であり；

$WR$ は、 $COOH$ 、 $PO_4$ 、 $SO_3H$ から成る群から選択される一成員である。

前記の一般式中、 $Y_a$ は、多数の反応基、例えばシアヌリルクロリド誘導体、アルデヒド、スクシンイミド、ベンズイミダゾール、対称ジスルフィド、ヘテロ二官能価PEGである。

本開示から、「生物学的関連物質」及び「生物活性剤」とは、薬物、分子、ペプチド、タンパク質、核酸配列及び蛍光色素又はその他の標識分子、及びPEGを包含するよう広義に用いられるが、これらに限定されない、と理解される。「PEG」という用語は、PEG誘導体を含むよう意図される、と理解される。

本発明のnErytは、生物活性剤と結合して、このような薬物のための担体を形成する。特に、小胞は生物活性剤、例えば薬物と結合して、生物活性剤が必要な身体の位置に有効に供給されるように生物活性剤の投与のための担体を提供し得る。小胞は、天然物質、生分解性、非免疫原性又は中等度の免疫原性ポテンシャルを有する、非毒性及び非発熱性、血液と完全相溶性、及び自系投与に適応性である。本明細書中及び添付の請求の範囲において、自系投与という用語は、哺乳類に投与されるナノエリスロソームが相溶性赤血球又は血液供給から得られる赤血球から調製されていた(同一哺乳類；即ち同一患者への及びそれからの投与を含む)ことを意味すると解釈されるべきである。ナノエリスロソームの非自系投与を意図する場合、nErytの免疫原性ポテンシャルを低減するのが好ましいけれども、免疫抑制又は非免疫抑制哺乳類へのその免疫反応性を低減するための処置を伴わないnErytの投与も、ある状況で

は意図される。

結合は、小胞の反応部位と反応する一次基、及び生物活性剤上の反応基と反応

する二次基を有するカップリング剤を用いて成し遂げられる。生物活性剤をナノエリスロソームに結合する多数の方法が存在し、当業界で十分公知である。これらの例としては、十分公知の架橋試薬、例えばホモ二官能価又はヘテロ二官能価型の二官能価試薬が挙げられるが、これらに限定されない。その例を以下に示す

:

アジドベンゾイルヒドラジド、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド;

N-[4-(p-アジドサリチルアミド)ブチル]-3'-[2'-ピリジリジチオ]プロピオンアミド;

p-アジドフェニル グリオキサル水和物;

4-[p-アジドサリチルアミド]ブチルアミン;

1-[p-アジドサリチルアミド]-4-[ヨードアセトアミド]ブタン;

ビス-[ $\beta$ -(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド;

ビスマレイミドヘキサノール;

ビス[スルホスクシンイミジル]スベレート;

ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシ)エチル]スルホン;

ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン;

N- $\gamma$ -マレイミドブチリルオキシースクシンイミドエステル;

N- $\gamma$ -マレイミドブチリルオキシースルホスクシンイミドエステル;

N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート;

N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート;

m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル;

m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル;

4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサノール-1-カルボキシルヒドラジド

・HCl;

4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド・HCl;

N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸;

N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸；

スルホスクシンイミジル [4-アジドサリチルアミド] ヘキサノエート；

3-[2-ピリジルジチオ] プロピオニルヒドラジド；

p-ニトロフェニル-2-ジアゾ-3, 3, 3-トリフルオロプロピオネート

；

2-ジアゾ-3, 3, 3-トリフルオロプロピオニルクロリド；

N-スクシンイミジル [4-アジドフェニル] 1, 3'-ジチオプロピオネート；

スルホスクシンイミジル [4-アジドフェニルジチオ] プロピオネート；

スルホスクシンイミジル 2-[7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセトアミド] エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート；

スルホスクシンイミジル 2-[m-アジド-o-ニトロベンズアミド] エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート；

N-スクシンイミジル-6-[4'-アジド-2'-ニトロフェ

ニルアミノ] ヘキサノエート；

スルホスクシンイミジル-6-[4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ] ヘキサノエート；

スルホスクシンイミジル 2-[p-アジドサリチルアミド] エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート；

N-ヒドロキシスクシンイミジル-2, 3-ジプロモプロピオネート；

N-スクシンイミジル [4-ヨードアセチル] アミノベンゾエート；

スルホスクシンイミジル [4-ヨードアセチル] アミノベンゾエート；

スクシンイミジル 4-[N-マレイミドメチル] シクロヘキサン-1-カルボキシレート；

スルホスクシンイミジル 4-[N-マレイミドメチル] シクロヘキサン-1-カルボキシレート；

スクシンイミジル 4-[p-マレイミドフェニル] ブチレート；

スルホスクシンイミジル 4-[p-マレイミドフェニル] ブチレート；

4-スクシンイミジルオキシカルボニル-メチル-a-[2-ピリジルジチオ]  
]トルエン；

スルホスクシンイミジル6-[a-メチル-a-(2-ピリジルジチオ)トル  
アミド]ヘキサノエート；

N-スクシンイミジル-3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート；

スクシンイミジル6-[3-[2-ピリジルジチオ]プロピオンアミド]ヘキ  
サノエート；

スルホスクシンイミジル6-[3-[2-ピリジルジチオ]プロ

ピオンアミド]ヘキサノエート；

スルホスクシンイミジル7-アジド-4-メチルクマリノ-3-アセテート；

及び

スルホスクシンイミジル4-[p-アジドフェニル]ブチレート。

多数の基を用いて、生物活性剤をナノエリスロソームに結合し得る、と理解さ  
れるべきである。このような基は、NH<sub>2</sub>、COOH、SH及びOH基を包含し  
、これらはナノエリスロソームの成分中に豊富に見出されるが、これらに限定さ  
れない。

カップリング剤は、生物活性剤の活性を有害に妨害すべきでなく、宿主に対す  
る複合毒性となるべきでない、と理解される。

多数の生物活性剤は本発明のナノエリスロソームに抱合されるか又はその中に  
閉じ込められ得るため、本明細書及び添付の請求の範囲から、生物活性剤という  
用語は、感光性化合物、薬物、抗生物質、抗新生物薬、抗炎症薬、タンパク質又  
はその一部、酵素、ヌクレオチド配列、核酸又はその一部、オリゴヌクレオチド  
、アンチセンス、遺伝子、ベクター、発現ベクター、放射性同位元素、アミノ酸  
類似体又はヌクレオシド類似体、並びにその他の医学的又は獣医学的に有用な薬  
剤、例えば対比物質（例えば、染料）及び診断物質、並びに成長因子、ホルモン  
、例えばコルチコステロイド等を含めるよう意図されるが、これらに限定されな  
い、と理解される。さらに、生物活性剤という用語は、少なくとも2つの生物活  
性剤の組合せを含めるよう、広義に解釈されるべきである、と理解される。

本明細書及び添付の請求の範囲から、医薬のという用語は、本発明のナノエリスロソームが哺乳類における多数の種類の治療、予防又は診断に適しているため、獣医学を含めると理解されるべきである。

本発明のナノエリスロソームは、診断手段としても役立つ得る。特定の種類の組織または細胞を標的するために、多くの種類の生物活性剤が、本発明のナノエリスロソーム、例えば抗体に結合される。標的の検出は、例えば、ナノエリスロソームに閉じ込められた、放射性又はそうでない標識、あるいは染料の使用を含めた、公知の方法により査定される。本発明のナノエリスロソームの診断的使用の多数の例の一つは、転移の存在を検出、定量又は分析するために、腫瘍性抗原に特異的な抗体を介して、この抗原を標的することである。

生物活性剤の選定、及びそれがナノエリスロソーム中に閉じ込められるか又はそれに抱合されるかは、所望の用途、供給の目的、供給経路、標的、及びナノエリスロソームの使用に関連したその他のパラメーターによる。

供給の目的によって、ナノエリスロソームは多数の経路により投与され得る：ヒト及び動物では、これらの例としては、注射（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、耳内、乳房内、尿道内等）、局所適用（例えば罹患領域）、及び上皮又は粘膜皮膚の内層（例えば、眼上皮、口腔粘膜、直腸及び膣上皮内層、気道内層、鼻咽頭粘膜、小腸粘膜等）を介した吸収によるものが挙げられるが、これらに限定されない。

調製物の投与方式は、化合物が供給される生体中の部位及び細胞を確定し得る。ナノエリスロソームは単独で投与され得るが、しかし一般的には意図された投与経路及び標準製薬実施に関して選定される医薬担体との混和物で投与される。このような製剤は、非傾向的に、例えば腹腔内、動脈内又は静脈内に注入され得る。製剤はさらに、口腔、皮下、筋肉内、そしてもちろん、臓器内経路を介して投与される。非経口投与に関しては、それらは、その他の溶質、例

えば溶液を等張にするのに十分な塩又はグルコースを含有する滅菌水性溶液の形態で、投与される。製剤の特別な特性によるその他の使用も、当業者により意図



され得る。エアロゾルによるナノエリスロソーム処方物の供給も、投与の一方法として意図される。

疾病状態の治癒的治療におけるヒトを含めた哺乳類への投与に関しては、処方する医療専門家が、投与対象のための適切な用量を確定し、これは、薬物、体重及び動物の反応、並びに疾患の性質及び重症度によって変わると予測される。同一成分を、ナノエリスロソームの診断的使用に適用し得る。ナノエリスロソーム処方物中の生物活性剤の用量は、本発明にしたがって、遊離生物活性剤に関して用いられるより低くされる。しかしながら、いくつかの場合には、等用量又はより高い用量を投与する必要がある。周期的治療又は異なる周期の治療が有益であることも意図される。

ナノエリスロソームの供給経路は、身体中のその分布に影響を及ぼす。ナノエリスロソームの受動的供給には、種々の経路の投与、例えば静脈内、皮下及び局所投与が含まれる。各経路は、ナノエリスロソームの局在化に差を生じる。ナノエリスロソーム及び生物活性剤の選定標的領域に対するターゲティングも意図される。

本発明の核酸配列は、天然糖ーリン酸塩主鎖、並びに修飾主鎖、例えばホスホロチオエート、ジチオネート、アルキルホスホネート及びヌクレオチド等を用い得る。修飾糖ーリン酸塩主鎖は一般に、Miller, 1988, 「Ann. Reports Med. Chem.」23:295及びMoran et al., 1987, 「Nucleic acid molecule. Acids Res.」14:5019により教示される。ある実施態様では、核酸配列は、特に放射線治療を可能にするために、放射能標識され得る。

本明細書中で用いる場合、「遺伝子」という用語は当業者には十分公知であり、単一タンパク質又はポリペプチドを限定する核酸配

列に関する。「構造遺伝子」とは、RNAに転写され、特定のアミノ酸配列を有するタンパク質に翻訳されて、それにより特定のポリペプチド又はタンパク質を生じるDNA配列を限定する。本発明の核酸配列が当業界で十分公知の多数の確立されたキットフォーマットのいずれかに取り込まれ得ることは、当業者には容易に認識される。

「ベクター」とは、当業界で一般に公知であって、プラスミドDNA、ファージDNA、ウイルスDNA等を限定し、本発明のDNAがその中でクローニングされ得るDNAビヒクルとして役立つ。多数の種類のベクターが存在し、当業界で十分公知である。

「発現」という用語は、構造遺伝子がmRNAに転写され（転写）、次にmRNAが1つ又はそれ以上のポリペプチド（又はタンパク質）に翻訳される（翻訳）工程を示す。

「発現ベクター」という用語は、前記のベクター又はビヒクルを限定するが、しかし宿主細胞中への形質転換後の挿入配列の発現を可能にすることを示す。クローン化遺伝子（挿入配列）は、通常は制御素子配列、例えばプロモーター配列の制御下に置かれる。このような制御配列下のクローン化遺伝子の配置は、しばしば、制御素子又は配列と操作可能に結合されると言及される。

発現制御配列は、ベクターが原核生物又は真核生物宿主又はその両方（シャトルベクター）において操作可能な結合遺伝子を発現するよう意図され、転写素子、例えばエンハンサー素子、終止配列、組織特異性素子および／または翻訳開始及び終結部位を付加的に含有し得る。

別の実施態様では、本発明は、本発明にしたがってナノエリスロソーム組成物を含有する少なくとも1つの容器手段を包含する本発明のナノエリスロソームを含有するキットに関する。好ましい実施

態様では、キットは1つ又はそれ以上の以下の試薬、即ち洗浄試薬、検出試薬等を含入するその他の容器を包含する。

本明細書中で用いる場合、「抗体」という用語は、モノクローナル及びポリクローナル抗体、並びにその断片、一本鎖抗体、イディオタイプの特定の分子及び抗体断片を含有する抗体断片を含む。したがって、抗体という用語は、本明細書中で用いる場合、 $F(A B')_2$ 断片、 $F(a b')$ 断片、 $F(a b)$ 断片及び $F_v$ 断片も含む。概して、抗体を調製及び修飾するための技術は、当業界で十分公知である（Harlow et al., 1988, 「Antibody-A Laboratory Manual, CSH Laboratories」 Campbell, 1984, 「Monoclonal Antibody Technology: Laboratory T

techniques in Biochemistry and Molecular Biology], Elsevier Science Publisher, Amsterdam, The Netherlands)。

ナノエリスロソーム組成物が広範な治療的用途を有することは、本発明から明らかである。このような用途の一例としては、核酸セグメントが患者に移され得る遺伝子療法が挙げられるが、これに限定されない。一実施態様では、本発明のナノエリスロソーム組成物は器官、組織または細胞に向けられる特定の配位子によりこの器官、組織または細胞の特異的ターゲティングを可能にする。

本発明のナノエリスロソーム組成物が遺伝子生成物のアゴニスト及びアンタゴニストを供給し得る、ということは明らかである。

本発明のナノエリスロソーム組成物を用いたアンチセンス分子の供給も意図される。アンチセンスの特異的設計及びその安定性を増大するためのその修飾は、当業界で十分公知である。

適切な医薬担体、賦形剤及び治療的又は診断的組成物は、概して、「Remington's Pharmaceutical Sciences」1980、第16版、a standard reference in this particular fieldに記載されている。

広範囲の細胞毒性剤及び薬物が本発明にしたがって用いられる、ということは、当業者には明らかである。細胞毒性剤の例としては、毒素、例えばジフテリア毒素が挙げられるが、これに限定されない。さらに、前記のように、放射性核種も本発明のナノエリスロソーム組成物に結合されて、細胞の局所的照射による細胞毒性作用を発揮して、放射線治療をなし得る。放射線治療に用い得る放射性核種は当業界で十分公知であって、特別な臨床的又は診断的状況に容易に適応される。

#### 図面の簡単な説明

好ましい実施態様を説明するために示した添付の図面を参照しながら、一般的に説明してきた本発明をさらに説明する。

図1は、診断的および／または治療的用途に用いられるナノエリスロソームを製造するために用いられる方法の要約を示す。

図2は、産生された異なるPEG分子を示す。

図3は、n E r y t 組成物の免疫原性ポテンシャルの有意の低減を実証する直接凝集試験を示す。

図4は、T 2 4 (A B) 及びE F F R O N 細胞(C D) の位相差顕微鏡A 及びB 及び蛍光顕微鏡写真B - D を示す。

本発明のその他の対象、利点及び特徴は、添付の図面を参照しながら以下の好ましい実施態様の説明を読めば、明らかになるが、実施態様はそれらに限定されず、単に例示のためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 好ましい実施態様の説明

図1は、診断的または治療的用途に用いられるナノエリスロソームを製造するために用いられる方法の要約を示す。

ナノエリスロソームの製造技法は、非経口的又は経腸的経路によるその投与をさらに調べることによる手法をとった。非経口経路に関しては、ナノエリスロソームをうまく用いて、それらが膀胱の癌細胞を同定し得ることを示した。端的に言えば、遠心分離によりナノエリスロソームを濃縮し、デキストラン-フルオレセインイソチオシアネートの濃縮溶液(デキストラン-F I T C : 分子量4000~ $2 \times 10^6$ ) 中で混合した。液体窒素中で凍結融解を1ラウンド終えた後、デキストラン-F I T C を被包したナノエリスロソームを、セファデックス又はセファロースを用いるゲルのサイズ排除による濾過(即ち、G-25又はPD10)により、あるいは洗浄-遠心分離を4サイクルおこなって、精製した。S P D P との一次反応により、ナノエリスロソーム膜を修飾した。多数の膀胱癌に認められる抗原である癌抗原T R O P - 2 を認識する選定抗体、この場合はモノクローナル抗体48-127を先ずS P D P で修飾し、その後還元剤、例えばD T T (ジチオトレイトール) で処理して、遊離S H 基を遊離させる。最後に、前記からの修飾ナノエリスロソーム、及びこれも修飾済みのモノクローナル抗体48-127を、ナノエリスロソーム-デキストラン-F I T C - 48127と呼ばれる組成物の生成を促すために、生理学的緩衝液中で一緒に混合した。この複合体を用いた生物学的検定は、48-127により認識されるT R O P - 2 抗原を保有する細胞が複合体により非常に選択的に装飾されたが、一方非T R O P - 2

保有細胞はそうではなかった。

デキストランを光線療法薬、例えばフタロシアニンオクタカルボン酸に置換した同様の種類の実験により、第一段階で、フタロシアニンは、本明細書中に記載した熱衝撃療法を用いて、ナノエリスロソームにより容易に捕獲されることが示された。第二段階では、4

8-127抗体のナノエリスロソーム-フタロシアニンとの結合が実行された。この結合後、細胞の標識化の評価、並びにin situでの膀胱の癌治療の点から見たフタロシアニンの光線療法特性を利用するための関連試験を実行する。この2種類の複合体（ナノエリスロソーム-フタロシアニン-48-127）は癌細胞に及ぼす有意の抑制効果を示すと予測される。

第三組の実験では、ナノエリスロソーム-シュードモナス毒素-48127複合体が高特異性を有する細胞毒性供給系として有意に用いられるということを示すために、免疫毒素、例えばシュードモナス属毒素がナノエリスロソーム中に被包されている。これら後者の2種類の複合体は、種々の膀胱癌の癌内治療に有用であることが示される。このような複合体は、薬物と標的化膀胱細胞とが非常に短期間接触される（これは、腎臓が生成した尿の膀胱中での急速な蓄積により引き起こされる）一般的に用いられる治療技法によりもたらされる主な問題を克服し得る。

併せて考えると、本発明は、ナノエリスロソームが、本発明の方法を用いて、分子量約1000（フタロシアニンオクタカルボン酸） $\sim 2 \times 10^6$ （デキストラン）の分子をを被包し得るということを示す。したがって、ナノエリスロソームは非常に多面的なドラッグデリバリーシステムである。さらに、デキストラン及びフタロシアニン分子は、6ヶ月以上もの間、ナノエリスロソームに安定に被包されることが示されている。

治療的経腸用途に関しては、ナノエリスロソームは、生物学的関連物質、例えば薬物、酵素、タンパク質（即ち、インスリン）、免疫調節化合物、ペプチド又は胃腸系に感受性のその他の物質の経口的投与を結果的に可能にし得る。このような修飾デリバリーシステムを得るために用いられる戦略は、前記の熱衝撃治療

法下でナノエ

リスロソーム内部に生物学的関連物質を被包することにある。第二工程では、ポリエチレングリコールの誘導体（PEG-シアヌリルクロリド等）をナノエリスロソームに抱合する。このようなポリエチレングリコール誘導体は、タンパク質及び酵素の抗原性を阻害し、生物学的半減期を増大することが知られている。したがって、このような系は、非自系及び非相同性ナノエリスロソームの使用を可能にする。

本発明は、多数のその他のPEG誘導体を用い得るために、PEG-シアヌリルクロリドに限定されない、ということに留意すべきである。このような誘導体は当業者には十分公知である。このようなPEG誘導体の例としては、活性化エステルを有するPEG誘導体が挙げられるが、これに限定されない。当然の帰結として、当業者は、本発明の教示をその他の種類のPEG誘導体に適応し得る。

好ましい実施態様では、ナノエリスロソームはPEG-5000-シアヌリルクロリドに抱合される。分子量約350~10,000のPEG誘導体が本発明にしたがって用いられるが、しかし約1,000~7,000、さらに好ましくは約2,000~10,000の分子量を有するPEG誘導体を用いるのが好ましい、と理解されるべきである。PEG修飾ナノエリスロソームの安定性は、一般に、デキストラン-FITC被包ナノエリスロソームを用いて試験される。インスリン-I125の被包及び安定性を立証し、種々の異なる種類の投与（静注、腹腔内及び経口）後の動物におけるこのようなナノエリスロソームの生物薬学的パラメーターを評価するために、実験が進行中である。さらに、経口投与した場合の薬理学的反応を誘導するインスリン又はホルモン、例えばLHRHを含有するナノエリスロソーム-PEGの能力が試験される。

これらの実験はすべて、ナノエリスロソームの多面性及び有用性

を実証する、と予測される。消化性物質、したがって胃液な導入感受性の物質は、ナノエリスロソームにより保護された場合、その生物学的活性を保持するということの実証は、概して、感受性物質の経口投与に大きな影響を及ぼし得る。

以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はそれらに限定されない。

#### 実施例 1

##### 血漿及びパuffyコート（白血球）の除去

哺乳類ドナー（ウマ、ウシ、ブタ、ヒト等）からの血液（2 x 30 ml）を500 x g（1500 rpm）で4℃で10分間、遠心分離した。血漿及びパuffyコートを吸引により除去した。液体を除去して、4℃で等容量のリン酸緩衝食塩水（PBS）（5 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、pH 7.4）と置き換えた。試験管を何度か逆さにして、混合物を静かに均質にした。次に、血液を500 x gで4℃で10分間、再遠心分離した。ここに記載した一連の手順を3回繰り返した。

以下のプロトコールは各々、滅菌条件下で実行した。

#### 実施例 2

##### 赤血球ゴースト低張衝撃物の調製

##### 方法 2. 1

実施例 1 に記載したように処理した血液 5 ml を 35 ml（50 ml Naigen<sup>TM</sup> 試験管中）の低張緩衝液（5 mMリン酸ナトリウム）、pH 7.4 に付加した。赤血球懸濁液を、25,000 x g で4℃で20分間、遠心分離した。

上清を吸引し、捨てた。除去した低張緩衝液の容量を同一容量の新鮮な緩衝液に置き換えて、懸濁液を再び遠心分離した。上清がわ

ずかに着色するまで、この手順を3回繰り返した。ペレットを5 ml の PBS 緩衝液、pH 7.4 中、4℃に懸濁した。ホワイトゴースト懸濁液をプールし、20分間の遠心分離（20,000 x g）により濃縮して、必要になるまで4℃で保持した。

##### 方法 2. 2

実施例 1 で処理したような 70 ml の血液を、低張リン酸又は炭酸緩衝液（2.5 mM）（2 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ；氷酢酸を用いて pH 調整）、pH 10~11 を用いて、セファロース CL 6B（CL 4B も）又はセファクリル S 400 カラ

ム（例えば、10cm×30cm）でクロマトグラフィー処理した。ホワイトゴーストを先ず収集し（死容量）、次にヘモグロビンをカラム上に保持した。酢酸を用いてpHを7.4とし、前記のような遠心分離によりゴーストを濃縮した。クロマトグラフィー処理により、ヘモグロビンを含有しないホワイトゴースト70mgを得た（1mg/mlの「洗浄血液」）。

### 実施例3

#### ナノエリスロソーム（nEryt）の調製

##### 方法3.1

米国特許第5,653,999号に記載されているようにして、ナノエリスロソームを調製した。約1 $\mu$ mの孔を有するポリカルボネートフィルターを通してゴーストが押し出される、ということを指摘することは重要である。ポリカルボネートフィルターは、ナノエリスロソームに粘着しないという利点を有する。ゴーストを等張懸濁液から、窒素圧下で押し出した。懸濁液は、好ましくは4回押し出される。

##### 方法3.2

この手法は、前記の3.1とは有意に異なる。それは、より速く

、且つナノエリスロソームのより良好な収率を生じるという利点を提供する。さらに、それは大規模生産により容易に利用可能である。

低張PB（pH7.4）中のホワイトゴーストの低張懸濁液（0.2mg/ml）を、直ちに約0.45 $\mu$ mの孔を有するポリカルボネート（ナイロン又はポリエーテルスルホン）フィルターに、その直後に約0.22 $\mu$ mの孔を有するポリカルボネート（ナイロン又はポリエーテルスルホン）フィルターに通して、真空濾過した。操作は、低張緩衝液（二価および/または三価陽イオン無含有）中で実行されねばならない。この基本的要件に応じなければ、フィルターはすぐに塞がり、使用不可能となる。この方法を用いる場合、フィルターを1回通すだけでよく、この工程で失われるナノエリスロソームは5～10%に過ぎない。方法3.1により得られたナノエリスロソームは、100～200nmの平均直径を有した。方法3.2により調製したnEryt懸濁液を用いた光散乱実験で、n



Erytは3つの集団に分けられた：a) 40~50nm；b) 100nm、及びc) 200nmのさらに小さい亜集団。しかしながら、方法3. 2により調製されたnEryt懸濁液の平均直径は、依然として約100~200nmであった。

#### 実施例 4

##### ナノエリスロソーム懸濁液の濃縮

nEryt懸濁液(0.2mgタンパク質/mlで350ml)を、アミコン濃縮機(モデル8400、500000より小さい分子切断片(例えばZM500及びYM100)を有する膜)を用いて10psiの窒素圧下で、静かに撹拌しながら、容積を50mlとした。

#### 実施例 5

##### nErytによる分子の閉じ込め(捕獲)

一般プロトコールを用いて、生物活性剤、例えばタンパク質(即ち、インスリン)、光学的作用剤(即ち、ポルフィリン様分子)、フルオロフォア(即ち、デキストリン(分子量4,000~2,000,000)-フルオレセインイソチオシアネート(FITC))、ヌクレオチド(即ち、DNA)、糖タンパク質、多糖類(即ち、イヌリン)、ビタミン、薬物(即ち、プレオマイシン)等を捕獲(閉じ込め)し得る。

エッペンドルフ試験管中で、nErytの懸濁液(1.5ml、1~2mg/ml)を16,000×gで4℃で10分間遠心分離した(microfuge™)。上清を取り出し、捨てた。ペレットのタンパク質含量を、十分公知の方法(即ち、市販キット)で確定した。捕獲(閉じ込め)される物質の濃縮溶液1mlをペレットに付加した。試験管を7回逆さにして懸濁液を静かに均質にして、4℃の室温で10分間保持した。その後、懸濁液を液体窒素中で2分間凍結させて、25℃の水浴中で融解した。ポルフィリン様分子、DNAのような分子のいくつかの捕獲が、室温で30分間インキュベーション後に観察されたことを指摘するのは重要である。しかし、熱衝撃処理は、生物活性剤の捕獲を有意に改良した。熱衝撃の必要性は、-70℃又は-20℃での凍結も用い得るので、-180℃工程に

よるものではない、ということに留意すべきである。ある種の生物活性剤に関しては、氷（0℃）でも十分であったが、とはいえ、特に-180℃での凍結と同様に有効であるというわけではない。

#### 実施例 6

捕獲（閉じ込め）分子を有する nEryt の精製

##### 方法 6. 1

捕獲処理後、1 ml の冷（4℃）PBS（等張、pH 7. 4）で

3～5 回希釈し、16, 000×g で 8 分間遠心分離して、上清を取り除き、PBS で再び希釈して、nEryt を未閉じ込め分子から遊離した。

##### 方法 6. 2

捕獲処理後、十分公知の方法により適切なセファデックス又はセファクリルカラムを用いてサイズ排除クロマトグラフィーにより、遊離分子を遅延させ、nEryt の溶離を迅速にして、未閉じ込め分子から nEryt を遊離させた。捕獲（閉じ込め）物質を、適切な洗剤を用いて nEryt を可溶化後に、通常の方法（閉じ込められている分子に適応）により評価した。

#### 安定性

捕獲により、デキストラン-FITC-nEryt の懸濁液が、4℃で保持されると少なくとも 7 ヶ月間安定であるという事実によって立証されたように、安定なナノエリスロソーム-生物活性剤組成物が形成された。さらに、DNA の閉じ込めを実行した。手短かに言えば、PBS（500 μl）中に懸濁した 200 ng の nEryt を、TKN 緩衝液（リン酸塩を排除するために）で 3 回洗浄した。TKN 緩衝液（10～300 μl）中の DNA（30～320 ng）を懸濁液に付加し、静かにホモジナイズした。懸濁液を 4℃で 10 分間インキュベートし、液体窒素中で 2 分間凍結し、その後 25℃で 4 分間インキュベートした。TKNM 緩衝液を用いて、前記のように懸濁液を処理した。

DNアーゼ（0. 1 U/μl の DNアーゼ I 溶液 100 μl）を含有する反応混合物をインキュベートして、余分の DNA を迅速に除去した。Mg<sup>2+</sup>（10 mM）又は Mn<sup>2+</sup>（1 mM）を混合物に付加した。

DNAアーゼで清浄にした後、PCRの慣用的プロトコールを用い

てnEryt-DNAを増幅し、nEryt内のベクターの存在を確認した。

表1

本明細書中に記載した技術を用いて、これらの例は、nErytによる捕獲の典型的結果を説明するが、これは同様の濃度の小型及び大型分子を反映する。

初期濃度 (mg/ml)	nEryt (mg/ml)	捕獲分子 ( $\mu$ g/mgナノ)
デキストラン-4000FITC		
2.6	1.3	15.6
2.6	2.6	13.4
2.6	3.9	12.1
DNA ( $\mu$ g/ml) *		
1.3	4	0.003
13	4	0.066
65	4	0.153

\*線状(3kb)又は超螺旋DNAに関して、同様の結果が得られた。

したがって、表1は、nErytによる捕獲の典型的結果を説明するこれらの例を示す。これは同様の濃度の小型及び大型分子を反映している。

#### 実施例7

nErytの凍結乾燥のための標本の調製

典型的調製は、pH7.4の低張PB又は等張PBS中のnEryt(又は、捕獲生物活性剤を有するnEryt、あるいは捕獲生物活性剤又はその表面のnEryt抗体を有するPEG結合nEryt)の懸濁液1ml(1mgのタンパク質)を付加することから

成る。500 $\mu$ lの以下の溶液凍結乾燥溶液(Lyo溶液) [(スクロース(263. % p/v (770mM))、ポリビニルピロリドン(分子量=10,000、18.1 % p/v ; (18mM))、EDTA(エチレンジアミン四酢

酸 三ナトリウム塩) ; 1 mM = L y o 溶液) を P B S 又は P B に p H 7 . 4 で溶解] を付加した。n E r y t が等張溶液中にある場合には、L y o 溶液は低張で、逆の場合は n E r y t は低張溶液中にある。n E r y t 標本は、- 2 0 ° C での凍結 ( 1 2 時間 ) - 2 5 ° C での融解 ( 1 6 時間 ) 、最後に 4 0 ° C で 1 8 時間加熱のサイクルを 7 回繰り返しても安定であった。

#### 凍結乾燥

1 0 m l バイアル中の前記で調製したような n E r y t の懸濁液 1 . 5 m l から成る典型的調製物を、液体窒素中で 2 分間凍結させた。次に懸濁液を、凍結乾燥機 Freezemobile™ 12EL Virtis (Virtis Company) を用いて、6 ~ 1 2 時間凍結させた。水中又は P B S 中の緩衝スクロース溶液 ( スクロース 2 5 . 5 % p / v ( 7 4 5 m M ) ) を凍結乾燥 n E r y t に付加すると、3 7 ° C で 1 時間、懸濁液をインキュベート後、閉じ込め分子のその機能を保持する n E r y t が生じた。すでに閉じ込め分子、例えばデキストラン- F I T C を有する n E r y t は依然として機能性で、非常に小さな癒合が顕微鏡で観察された。

#### 実施例 8

ポリエチレングリコール及びモノクローナル抗体とナノエリスロソームとの抱合

以下の構造を有する P E G を、公知の方法により実験室で調製した：

メトキシ P E G - S - スクシンイミジルコハク酸エステル ( 分子

量 = 2 0 0 0 ) ( M P E G - S s u c - s u c - 2 0 0 0 ) の n E r y t との抱合。

最終容量 7 5 0  $\mu$  l の P B S ( p H 7 . 4 ) 中の n E r y t 1 . 5 m g の懸濁液に M P E G - S s u c - s u c - 2 0 0 0 を付加して、1 . 8 3 n M ( 2 . 7 m g ) の最終濃度を得た。懸濁液を室温で 1 時間保持し、懸濁液を一定速度で転倒させることにより静かにホモジナイズした。混合物を、セファロース C L 6 B カラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。抱合の収率を評価した結果、M P E G - S s u c - s u c - 2 0 0 0 の n E r y t との抱合は 1 1 % と示された ( L J . K a r r , D L . D o n n e l l y , A . K o z l o w s k i a n d J . M i l t o n - H a r r i

s, 1994, 「Methods in Enzymology」 228:377)。

メトキシPEG-S-スクシンイミジルコハク酸エステル (分子量=2000)  
(MPEG-Ssuc-suc-5000) のnErytとの抱合。

最終容量500 $\mu$ lのPBS (pH7.4) 中のnEryt 0.5mgの懸濁液に、MPEG-Ssuc-suc-5000を付加して、5.79nM (14.47mg) の最終濃度を得た。懸濁液を室温で1時間保持し、懸濁液を一定速度で転倒させることにより静かにホモジナイズした。混合物を、セファロースCL6Bカラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。抱合の収率を評価した結果、MPEG-Ssuc-suc-5000のnErytとの抱合は14%と示された (LJ. Karr, DL. Donnelly, A. Kozlowski and J. Milton-Harris, 1994, 「Methods in Enzymology」 228:377)。

メトキシPEG-O-CH<sub>2</sub>COOSスクシンイミジルプロピオン酸エステル  
(分子量=5000) (MPEG-O-SPA suc

-5000) のnErytとの抱合。

最終容量500 $\mu$ lのPBS (pH7.4) 中のヒトnEryt 0.5mgの懸濁液に、MPEG-O-SPA-5000を付加して、0.03Mの最終濃度を得た。懸濁液を室温で1時間保持し、懸濁液を一定速度で転倒させることにより静かにホモジナイズした。混合物を、セファロースCL6Bカラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。フルオレスカミンを用いて抱合の収率を評価した結果、nErytとの抱合は30%と示された (LJ. Karr, DL. Donnelly, A. Kozlowski and J. Milton-Harris, 1994, 「Methods in Enzymology」 228:377)。

#### 実施例9

##### PEG結合nErytの免疫原性

実施例8のMPEG-Ssuc-suc-5000と結合したnEryt調製物の免疫原性をモニタリングするために、等量の親ウマ赤血球 (HRBC)、非PEG抱合nEryt (nEryt) 及びPEG抱合nEryt (nEryt-PEG) により誘導された抗体反応を分析した。

各々3匹のマウスを含有する4群を、250mgまで(ブタの)の又は200mlのリン酸緩衝食塩水(PBS)の用量に対して $2 \times 10^6$  cHRBC、nEryt (PEGと抱合したもの又はしていないもの)で、腹腔内注入で免疫化した。3回目の免疫処置から1週間後、各マウスから血清を採取して、直接及び間接凝集試験で親HRBCに対する抗体の存在に関して試験した。

各血清標本をPBS中で滴定し、各々の希釈液25mlを、96ウエルプレート(丸底)の個々のウエル中のHRBCの10%溶液25mlに付加した。これらを室温で15~25分間インキュベートし、倒立顕微鏡を用いて凝集を採点した。

図3に示したように、親HRBCで免疫化したマウスは約1:300血清希釈で50%の最大凝集を示した。nErytで免疫化したマウスは、1:100の血清希釈で50%最大凝集を示し、nEryt-PEGで免疫化したマウスは、1:10の血清希釈で50%最大凝集を示した。したがって、nEryt-PEGによる最大凝集は、非免疫対照マウス(血中抗原群に対する天然抗体の存在を反映)の場合と区別できないという結果が示された。

間接凝集試験は、IgM抗体の存在を有効に測定した。IgM抗体を測定するために、抗マウスイムノグロブリンを、前記の直接試験で用いたHRBCに、PBS 200ml中でHRBCを3回洗浄し、各洗浄の間に上清を吸引した後、付加した。抗マウスイムノグロブリンは、1:100の濃度で用いた。室温で15分間インキュベート後、倒立顕微鏡を用いて、凝集を再び採点した。この分析からの結果は、nErytの1:100希釈液中及びnEryt-PEGの1:10希釈液及び対照血清中で、凝集がここでも検出されたというものであった。したがって、nEryt-PEGは、nEryt-PEGによる凝集の負荷が対照血清に匹敵するため、非免疫原性であった。

#### 実施例10

ヘテロ二官能性PEGを用いたモノクローナル抗体のnErytとの抱合

イミノチオランのnErytとの抱合

先ず、イミノチオラン(IT)の新鮮な溶液を、PBS-EDTA(5mM

$K_2PO_4$ 、150mM NaCl、5mM EDTA、pH7.4)中に調製した(4.7M)。溶液を氷上に保持した。4mgのnErytを冷PBS-EDTA緩衝液中に懸濁し、IT溶液を付加して、627mM(IT)の最終溶液中のnEry

t 1mg当たりIT 100 $\mu$ molという比が得られた。混合物を90分間静かに攪拌しながら暗室中で4℃に保持した。インキュベーション後、混合物をセファデックスG-25(PD-10)上で精製した。端的に述べると、使用前に、クロマトグラフィーカラムを20mlの冷PBS-EDTAで平衡させた。混合物をカラム上に適用し、冷PBS-EDTAで溶離した。先ず2.5mlを捨て(死容量)、nErytをその下の2.5ml分画中に収集した。次の反応前に、標本を氷上に保持した。nEryt-ITは不安定であり、その場で調製される必要がある。

#### 実施例11

ヘテロ二官能性PEGのモノクローナル抗体48-127への抱合

先ず、PEG2000NHS-MAL:



の新鮮な溶液を調製した。つぎに、4.7mM EDTAを含有するPBS中の48-127(0.8mg/ml)の溶液を調製した。200nmolのPEG2000NHS-MALを0.4mgの48-127に付加した(PEGの最終濃度は0.4mM)。モノクローナル抗体48-127は、T16とは異なるエピトープでのgp54癌マーカーを認識する。溶液を、攪拌しながら30℃で30分インキュベートした。混合物を、0.5%のウシ血清アルブミンを含有するPBS 5mlを用いて予め平衡させたPD-10カラム上で分離させ、冷PBS-EDTA緩衝液 20mlで洗浄した。混合物をカラムに適用し、冷PBS-EDTAで溶離した。最初の2.5mlを捨て(死容量)、その下の2.5ml分画中にnErytを収集した。次の反応まで、標本を氷上に保持した。

## 実施例12

修飾48-127のnEryt-IT誘導体との抱合

冷PBS-EDTA緩衝液(600 $\mu$ l)中のnEryt-IT(960 $\mu$ g)の懸濁液に、PEGで修飾した48-127の160pg(1mlのPBS-EDTA中)を付加した。混合物を、静かに攪拌しながら4℃で18時間インキュベートした。溶離液として冷PBSを用いてセファロースCS6Bカラム上で、混合物を分離した。

## 実施例13

結合剤としてSMCCを用いたモノクローナル抗体のnErytとの抱合

イミノチオランのnErytとの抱合

まず、イミノチオラン(IT)の新鮮な溶液を、PBS-EDTA中に調製した(2M)。溶液を氷上に保持した。nErytを冷PBS-EDTA緩衝液中に懸濁し、IT溶液を付加して、nEryt1mg当たりIT 100 $\mu$ molという比が得られた(320 $\mu$ lのPBS-EDTA中にnEryt 3mg、677 $\mu$ lのPBS-EDTA中に151 $\mu$ lのIT)。混合物を90分間静かに攪拌しながら暗室中で4℃に保持した。インキュベーション後、混合物をセファデックスG-25(PD-10)上で精製した。端的に述べると、使用前に、クロマトグラフィーカラムを20mlの冷PBS-EDTAで平衡させた。混合物をカラム上に適用し、冷PBS-EDTAで溶離した。最初の2.5mlを捨て(死容量)、nErytをその下の2.5ml分画中に収集した。次の反応前に、標本を氷上に保持した。nEryt-ITは不安定であり、その場で調製される必要がある。

SMCCのモノクローナル抗体48-127との抱合

まず、DMSO中にスクシンイミジル4-(*n*-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート(SMCC、3.25mg/ml DMSO(10mM))の新鮮溶液を調製した。溶液を室温に保持した。4.7mM EDTAを含有するPBS(700 $\mu$ l)中の48-127(1mg)の溶液を調製した。125nmolのSMCCを付加し、反応物の容量を712 $\mu$ lとした。溶



液を攪拌しながら30℃で30分間インキュベートした。0.5%ウシ血清を含有するPBS 5mlを用いて予め平衡させたPD-10カラム上で、混合物を分離させ、冷PBS-EDTA緩衝液20mlで洗浄した。混合物をカラム上に載せ、冷PBS-EDTAで溶離した。最初の2.5mlを捨て（死容量）、nErytをその下の2.5ml分画中に収集した。次の反応前に、標本を氷上に保持した。

#### 修飾48-127のnEryt-IT誘導体との抱合

冷PBS-EDTA緩衝液（2.5ml）中のnEryt-IT（3mg）の懸濁液に、PBS-EDTA緩衝液（1.6ml）中のSMCCで修飾された48-127を0.66mg付加した。混合物を静かに攪拌しながら4℃で24時間インキュベートした。溶離液として冷PBSを用いてセファロースCS6Bカラム上で、混合物を精製した。

#### 実施例14

##### nEryt-SMCC-48127組成物を用いた免疫蛍光検査法

モノクローナル抗体48-127が反応するgp54抗原を保有する細胞、又はgp54を発現しないEFFRON細胞（陰性対照）を、周知の方法により、免疫蛍光検査のために調製した。

##### nEryt-SMCC-48127組成物を、前記（実施例6）

のように処理した。その結果生じたnEryt（FITC）-SMCC-48127組成物（15mg/ml）を、公知の方法により、T24細胞及びEFFRON細胞とともにインキュベートした。

端的に述べると、T24細胞及びEFFRON細胞は、それぞれ120継代及び50継代培養後に用いた。細胞を5日間増殖、合流させて、2%EDTA及び2%デキストロースを含有するPBSを用いて培養皿を取り外した。5×10<sup>5</sup>個の細胞を、6ウェルの皿の底にある22cm<sup>2</sup>の滅菌スライドに移した。使用した培地は、7.5%植物血清及び抗生物質を含有するMEMであった。細胞を、5%CO<sub>2</sub>の存在下で37℃で4日間増殖させた。7.5%CAV血清及び5%血餅血清を含有するMEMを用いた非特異的部位の遮断後、nEryt-デキ

ストラン- FITC 48127 組成物を細胞上に固定した ( $15 \mu\text{g}/\text{m}$ )。細胞及びナノエリスロソーム組成物を、5%  $\text{CO}_2$  存在下で  $37^\circ\text{C}$  で1時間インキュベートした。スライドを、CAV血清を含有するMEM (3 ml) 及びPBS ( $2 \times 3 \text{ ml}$ ) で洗浄した。スライドを顕微鏡スライドガラスの上に載せ、2 ml のPBSですすいだ。

図4は、免疫蛍光検査結果を示す。簡単に述べると、図4A及び4Cは、それぞれT24及びEFFRON細胞の位相差顕微鏡写真 (400倍) である。図4B及び2Dは、蛍光顕微鏡下での4A及び4Cと同じ顕微鏡視野を示す。明示されているように、nEryt-デキストリン-FITC-48127 (SMCC) 組成物は、円形の小胞により観察されるnErytの完全性、並びにgp54 Ag-発現細胞 (T24) を特異的に認識する48-127抗体の生物学的活性を保存している。したがって、この結果は、nErytの特定細胞に対する標的可能性を実証する。実施例6の捕獲方法にしたがって我々が次に試験したnEryt-SMCC-4812

7を用いて同様の結果がえられた、ということに留意すべきである。

#### 実施例15

結合腕としてSPDPを用いたモノクローナル抗体のnErytとの抱合

N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP) のnErytとの抱合

まず、N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP, 20 mM (1 mg SPDP)) の新鮮な溶液を、メタノール ( $160 \mu\text{l}$ ) 中に調製した。3 mgのnErytをpH7.4のPBS  $500 \mu\text{l}$  中に懸濁し、 $150 \mu\text{l}$  ( $1 \mu\text{mol}$ ) のSPDPを付加した。懸濁液を静かに攪拌しながら  $30^\circ\text{C}$  で30分間インキュベートした。混合物を、20 mlの冷PBS、pH7.4で予め平衡させておいたPD-10カラム上で精製した。混合物をカラム上に載せて、冷PBSで溶離した。最初の2.5 mlを捨て (死容量)、nErytをその下の2.5 ml分画中に収集した。次の反応前に、標本を氷上に保持した。

## SPDPのモノクローナル抗体48-127との抱合

まず、メタノール(160  $\mu$ l)中にN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP、20mM(1mg SPDP))の新鮮溶液を調製した。溶液を室温に保持した。PBS(425  $\mu$ l)中の48-127(2.5mg)の溶液を調製した。120nmolのSPDP(17  $\mu$ l)を48-127溶液に付加した。溶液を攪拌しながら30℃で30分間インキュベートした。冷酢酸緩衝液(酢酸ナトリウム100mM; NaCl 145mM、pH 4.5)20mlを用いて予め平衡させておいたPD-10カラム上で、混合物を分離させた。混合物をカラム上に

載せ、冷酢酸緩衝液で溶離した。最初の2.5mlを捨て(死容量)、nErytをその下の2.5ml分画中に収集した。次の反応前に、標本を氷上に保持した。分子のジチオピリジル部分を、190  $\mu$ lのDTT溶液(酢酸緩衝液、pH 4.5中のジチオトレイトールの1M溶液)とともにカラムから収集した48-127-SPDPの懸濁液(3.6ml)を室温で20分間インキュベートすることにより還元的に切断した。10mM Hepes及び145mM NaCl、pH 7.4を含有する冷緩衝溶液で平衡させたPD-10カラム上で、混合物を精製した。

## 修飾48-127のnEryt-IT誘導体との抱合

冷PBS(2.5ml、pH 7.4)中のnEryt-SPDP(3mg)の懸濁液に、SPDPで修飾された48-127を1mg付加した。混合物を静かに攪拌しながら4℃で18時間インキュベートした。溶離液として冷PBS、pH 7.4を用いてセファロースCL6Bカラム上で、混合物を分離した。

これらの反応は、「捕獲」デキストラン-FITC(分子量4000~2,000,000)を有するnErytを用いて実行されたが、修飾nEryt組成物は依然として活性且つ安定であることが示された。

## 結論

したがって、本発明は、ナノエリスロソームの調製のための簡単、有効、且つ定量的方法を教示する。米国特許第5,653,999号の教示にしたがって、

それにより精製されたナノエリスロソームは、種々の生物活性剤を閉じ込めるか又は捕獲し得る。ナノエリスロソームによる生物活性剤の新規の捕獲方法も開示される。生物活性剤を閉じ込めるか又はそれと結合する本発明のナノエリスロソームは、PEG化（PEG誘導体によるナノエリスロソームの膜上

の基の置換）によりさらに修飾される。いくつかのPEG誘導体が調製され、ナノエリスロソームと抱合された。このようなナノエリスロソーム-PEG置換組成物は、ナノエリスロソームの免疫原性を無くすることが示された。さらに、モノクローナル抗体を保有するヘテロ二官能性PEGは、閉じ込めデキストラン-蛍光色素抱合体を有するナノエリスロソームと抱合されたが、*in vitro*の結果は、このモノクローナル抗体保有PEG-ナノエリスロソーム組成物が、抗体により認識された抗原を発現する細胞を特異的に装飾することを示した。

その好ましい実施態様により本発明を前記で説明してきたが、添付の請求の範囲に定義された本発明の精神及び性質を逸脱しない限り、本発明は修正され得る。

【図1】

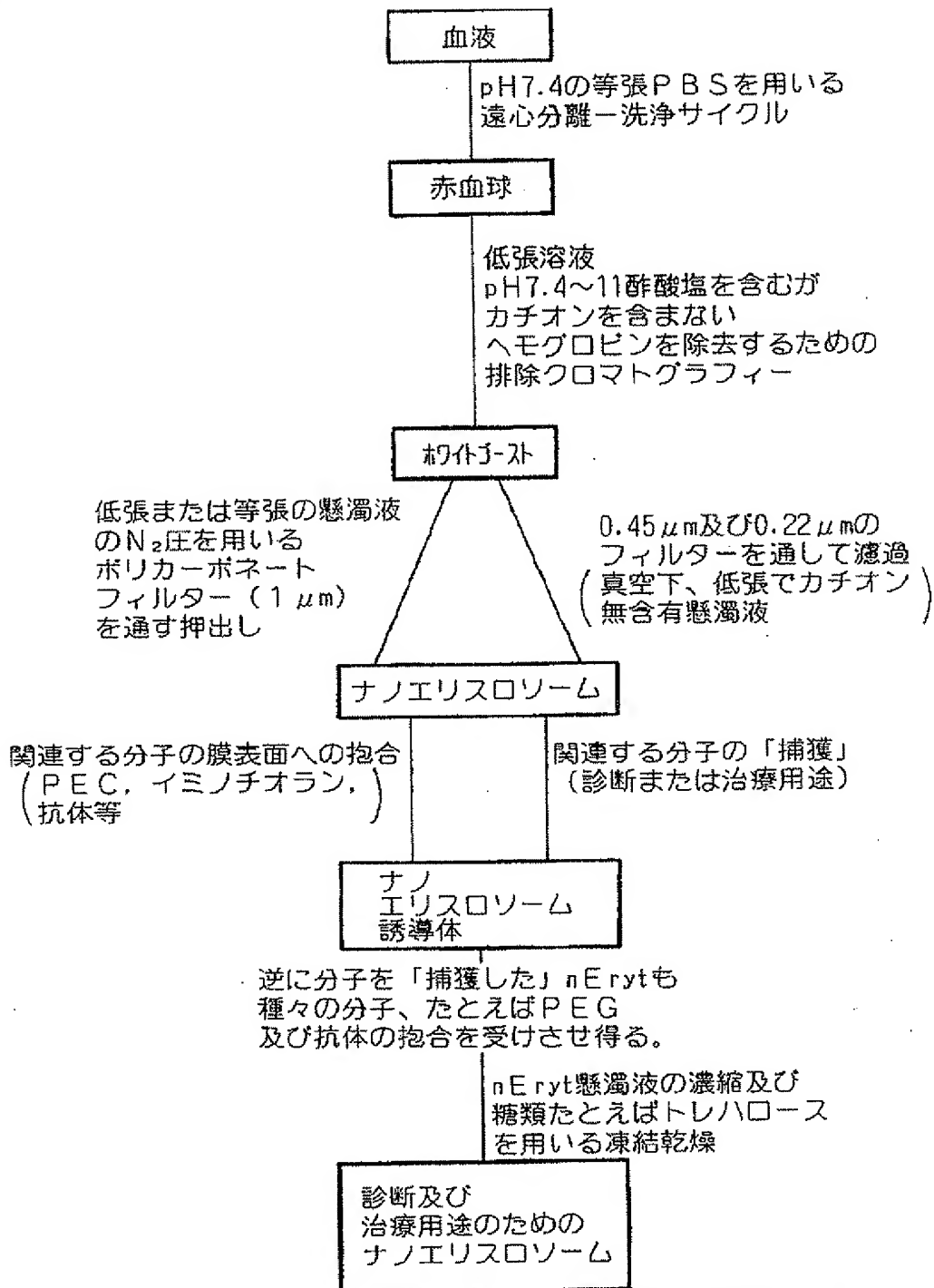
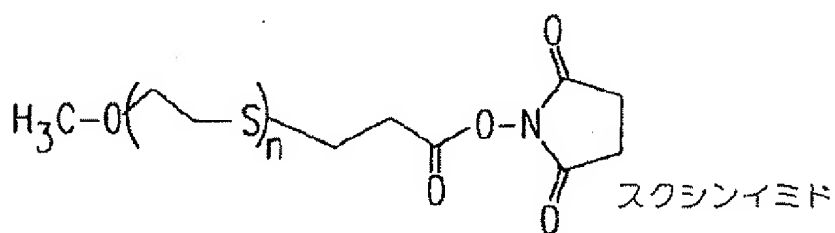
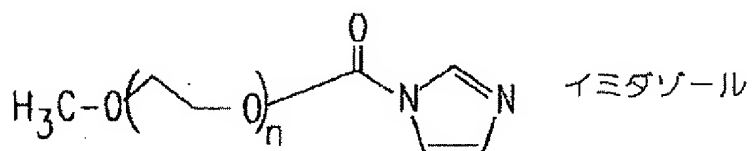
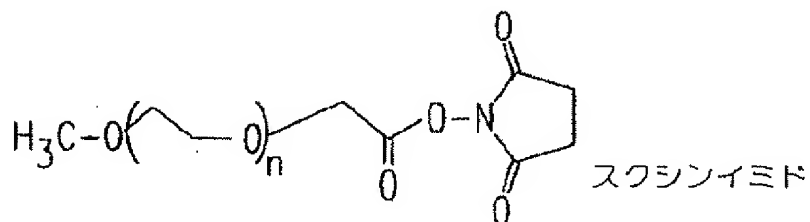
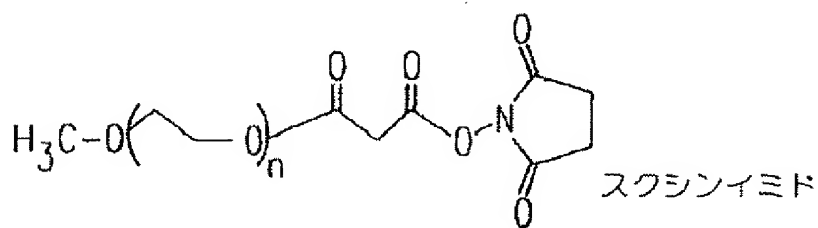
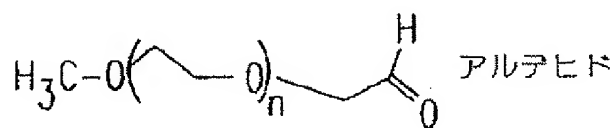
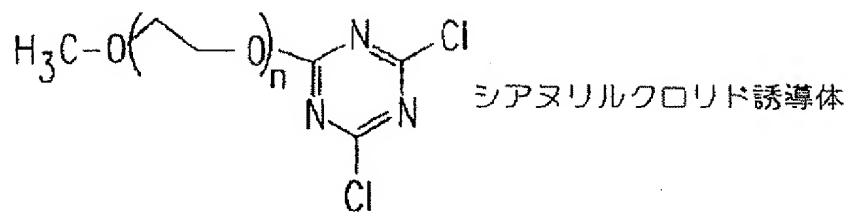


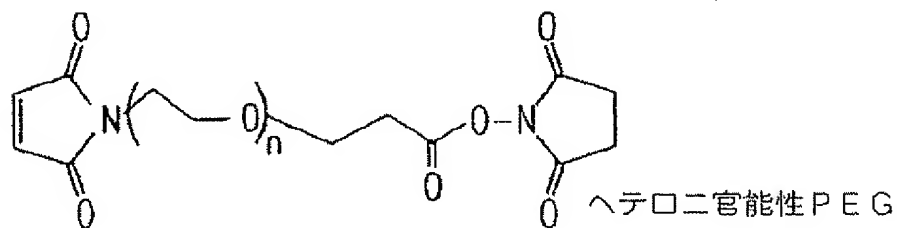
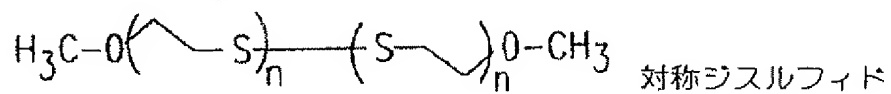
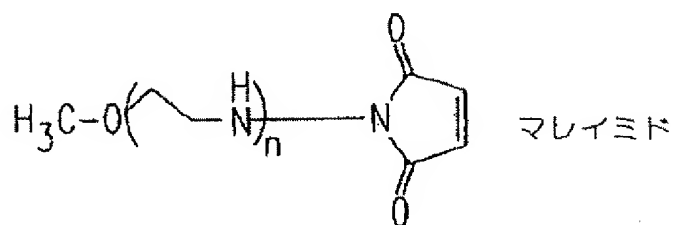
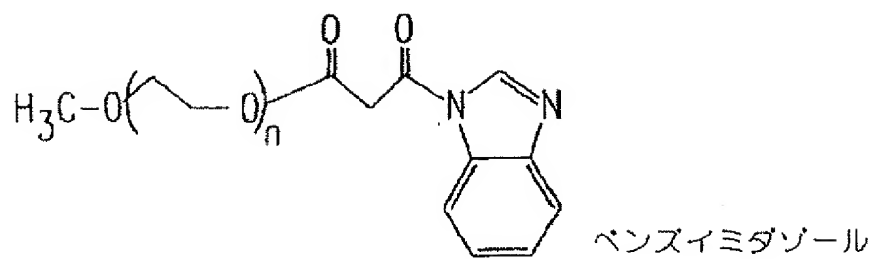
Figure 1

【図2】



フェニル - 2A

【図2】



【図3】

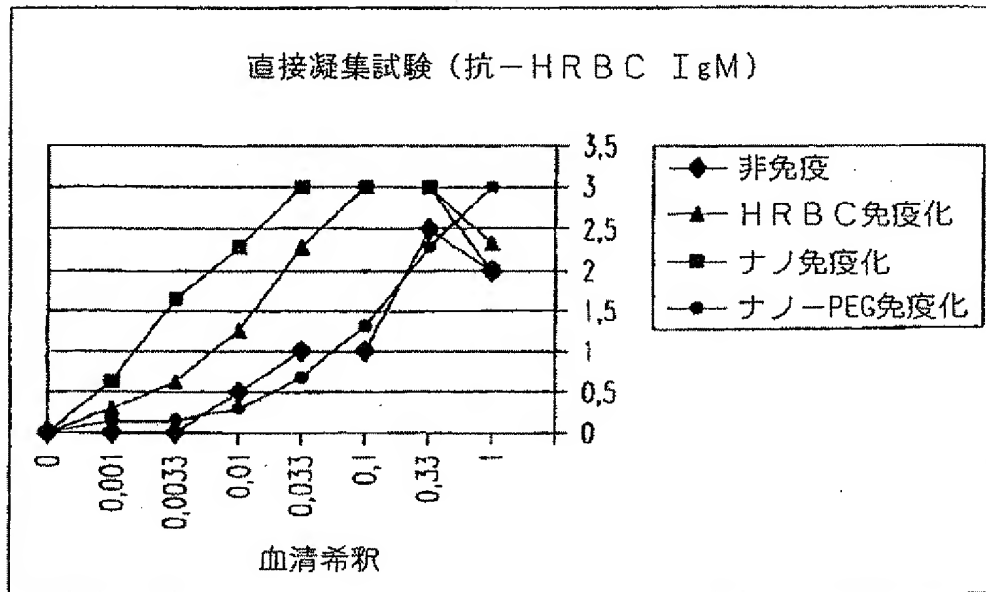


FIG. 3



【図4】

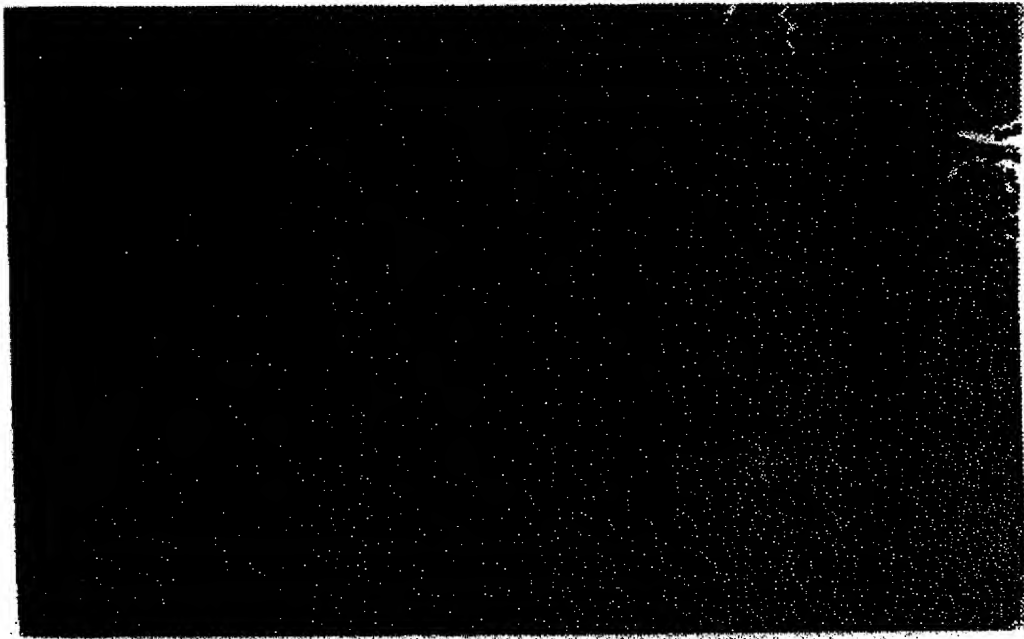


FIG. 4A

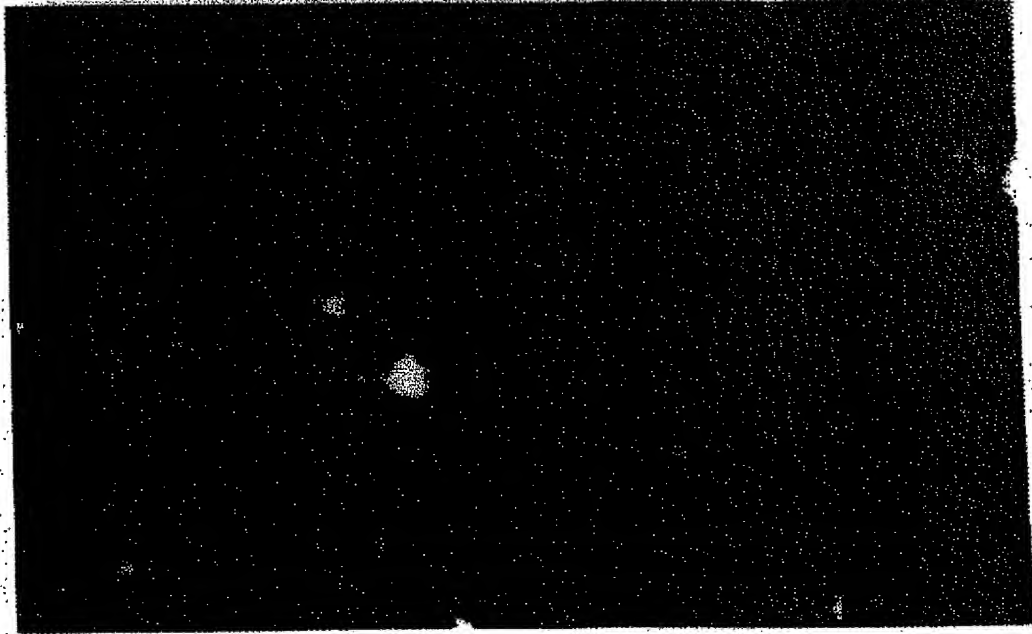


FIG. 4B

【図4】



Fig. 4



Fig. 4

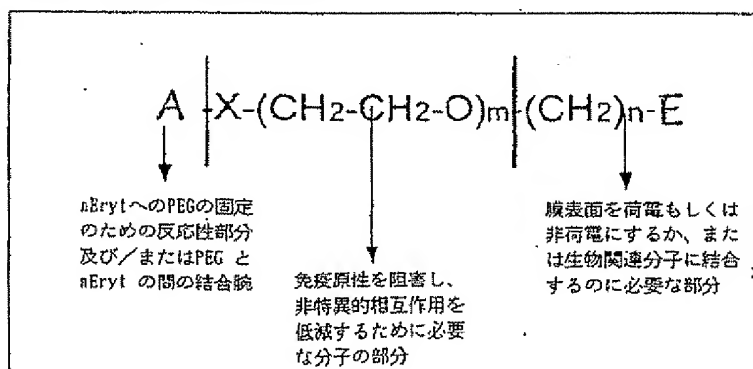
【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成10年11月6日（1998. 11. 6）



【補正内容】


小胞の生物学的活性を阻害することなく nEryt の免疫原性ポテンシャルを低減するのに有用である、ということが判明した。前に述べたように多数の出版物及び特許がタンパク質又はリポソームに結合する PEG の論題に関して存在するが、しかし本出願は先ず、nEryt 小胞の完全性を有意に危うくせずにナノエリスロソームが PEG と結合し得る、ということを示す。nEryt-PEG 結合技術は、多数のパラメーターが関係するため、開発するのが困難であったことを指摘しなければならない。

nEryt-PEG 結合の努力の複雑さにしたがって枠組みの設定に役立てるために、PEG の以下の一般式及びその説明を示す。



「A」は、PEG と nEryt 膜中に存在するタンパク質との抱合に関与する基である。その反応基の組成物は、利用可能な反応基、例えばアミノ基、例えばリシン残基との PEG 抱合の動力学的制御のために非常に重要である。i) 活性化エステル、例えばスクシ

ニミド (  ) エステルにより例示される  $NH_2$  基 (即ち、リシン残基) ; 及び ii) マレイミド (  )、2-チオピ

リジル (  ) 誘導体及びジスルフィド基により例示される

S H基（即ち、ジステイン残基又はリシンのイミノチオラン誘導体）のために、タンパク質上に存在する2つの族の求核性試薬をターゲッティングする2種類の反応基が用いられた。n E r y t膜は、当業者により、公知の方法で修飾されて、P E G又はその他の物質を抱合する相手として役立ち得る反応基を提供および/または修飾する。

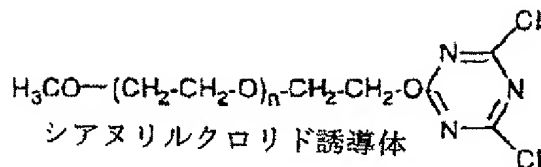
好ましい態様では、Aは塩化シアヌル、シアノーゲンハライド（B r またはC l）及びメシル基及びトシル基を含むO H-活性化剤から成る群から選択される。

他の好ましい態様では、Aは $Z-C(R')=CH_2$ または $Z-CH=CH$ でも表わすことができ、ZはCOOH、HO（アルデヒド）、H、OH（ヒドロキシル）、NH<sub>2</sub>及びSHから成る群から選択される一成員であって、R'は1～5の炭素原子の低級アルキルである。

他の好ましい態様では、Aは $D-C(=O)-$ でも表わすことができ、DはH、N<sub>3</sub>、OH、CH<sub>3</sub>、-NH-NH<sub>2</sub>、無水物、混合無水物または活性化エステル、たとえば、当業者に知られており、M. Bodanskyにより、「Principles of peptides synthesis:chapter II, Activation and coupling」（Haftner他、1984年、Springer-Verlag編、ニューヨーク、pp. 9～52）において定義及び例示されているもの、からなる群から選択される一成員である。

他の好ましい態様では、Aは $Q-(CH_2)_n$ でも表わすことができ、式中、Q= $-C(=O)-$ 、N、SでO=1～8の炭素原子、好ましくは2～5の炭素原子である。特定のO使用は、所望の特定のn E r y t-P E G組成物及びその用途に依存して、熟練者に

より容易に適応し得る。一般にOが8より大であると、分子は過脂溶性になる傾向がある。A基はポリエチレングリコールのOH基を直接にタンパク質に抱合化する方法は非常に少ないから、重要な基である。1つの例外は、予備実験で用いられた塩化シアヌル誘導体である



PEGをnErytに結合するのに有用な活性化基のいくつかの例を以下に示す：

臭化シアン (BrCN)、脱アミノ酸エステル (Zalipsky et al., 1984, 「J. Macromol. Sci. Chem.」 A21:8339; Mutter et al., 1979, 「The Peptides」 Gross et al., eds., 2, p.285, Academic Press, New York)、ヒドラジン誘導体 (Rubinstein, 1978, 米国特許第4, 101, 380号; Davis et al., 1979, 米国特許第4, 179, 337号及びPersson et al., 1988, 「J. Chromatog.」 457:183)、炭酸スクシンイミダジル誘導体 (Miron et al., 1993, 「Bioconjugate Chem.」 4:568; Zalipsky et al., 1993, 「Bioconjugate Chem.」 4:296及びZalipsky et al., 1991, 「Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems」 Dunn et al., 編., ACS, Washington, DC)、オキシカルボニルイミダゾール誘導体 (Allen et al., 1991, 「Biochem. Biophys. Acta」 1066:29; 及びTondelli et al., 1985, 「J. Controlled Release」 1:25)、炭酸ニトロフェニル誘導体 (Satore et al., 1991, 「Appl. Biochem. Biotech.」 27:45)、トレシレート誘導体 (Klibanov et al., 1991, 「Biochem. Biophys. Acta」 1062:142; Delgado et al., 1990, 「Biotech. Appl.

Biochem.」 12:119)、マレイミド誘導体 (Kogan, 1992, 「Synthetic Commun.」 22:2417及びRomani et al., 1984, 「Chemistry of Peptides and Proteins」 Volter et al., 編. 2, p29, Walter de Gruyter, Berlin)。

その他のOH「活性化剤」、例えばメシル、トシル基から成る群から選択される一成員である。Yが低級アルキル [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>; n=1~7] の群から選択される一成員である場合には；Q=—C= (O)、N、Sである。

「X」原子は、存在しないかまたは酸素 (エーテル)、硫黄 (チオエーテル) 原子、又は—O—C (O) (エステル)、—N—C (O) (アミド) 及び—S—

C(O) (チオエステル)である。チオアルキル、アルコキシ結合及びアミド生物学的に安定であるが、しかしながら、エステル及びチオエステル結合は、それらが多少迅速な動力学を用いて生物学的媒質中で加水分解されるため、非常に不安定である。加水分解動力学は、A部分の長さに関連する。しかしながら、それらは、徐放装置として用いられるnErytの設計に非常に有用であると立証される。nErytと生物学的関連分子又は生物活性剤との間の結合が安定であるか不安定であるかは、当業者により確定される。概して、安定結合が好ましいけれども、不安定結合に関する実用性の例としては、nEryt組成物を特定位置に標的化した後に、nErytの貪食作用がそれをPEG分子に連結する結合の破壊により免疫原性にする、そしておそらくはマクロファージにより生物活性剤を被包するのが望ましい状況が挙げられるが、これに限定されない。

分子の $(CH_2-CH_2-O)_m$ 部分は、ポリエチレングリコールそれ自体である。mは、1～500のいずれかである。したがって、350～10,000の分子量、好ましくは1,000～10

,000、さらに好ましくは2,000～5,000の分子量を有するPEGが用いられる。

最後に、 $[(CH_2)_n-E]$ 基は、nEryt周囲の媒質に面する。この基の性質が本発明の用途にとって決定的であることは明らかである。例えば、 $(CH_2)_n-E$ は、nErytが簡単な担体(DNAワクチン)として、又は粘膜(肺、小腸)を介した吸収のために包含される用途においては、免疫反応を妨げるために、好ましくは不活性基、例えば $OCH_3$ であるべきである。しかしながら、電場(マイクロチップ)におけるnErytの特異的置換を要する診断用途に関しては、 $(CH_2)_n-E$ は正電荷(即ち、 $-NH_2$ )又は負電荷(即ち、 $-COOH$ )荷電基でなければならない。 $(CH_2)_n-E$ はさらに、ポリエチレングリコール誘導体が生物学的関連分子、例えば抗体を細胞又は特定の器官を標的にするために結合し、その一方でnErytの固有の免疫原性を阻害するのに必要とされる場合には、SH、2-チオピリジル又はマレイミドのような基である。前記の点から見て、 $[(CH_2)_n-E]$ 基の性質は特定の用途又は使用の特別な必

要件を満たすよう適応される、ということは、当業者には容易に明らかになる。

好ましくは、 $n = 1 \sim 7$  個の炭素原子である。

E は、H、COOH、PO<sub>4</sub>、SO<sub>3</sub>H もしくは複素環または WR（式中、W は O、N、S、 $-C(=O)-$  から成る群から選択される一成員である）から成る群から選択される一成員であり、式中、

W =  $-O-$  である場合、R は：H、1～7 個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-R''$ （ここで、R'' はポリアミン誘導体、例えばスベルミン、スベルミジン又はプトレセインである）から成る群から選択される一成員である。

W =  $-N-$  である場合には、R は：H、1～7 個の炭素原子を有

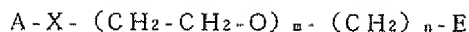
する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-C(=O)-R''$ （ここで、R'' はスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである）、1 個又は 2 個の COOH、SO<sub>3</sub>H 又は PO<sub>4</sub> 基を保有する 1～6 個の炭素原子の低級アルキルから成る群から選択される一成員である。

W =  $-S-$  である場合、R は：H、1～7 個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-C(=O)-R''$ （ここで、R'' はスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである）から成る群から選択される一成員である。

W =  $-C(=O)-$  である場合、R は：H、1～7 個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-R''$ （ここで、R'' はスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである）から成る群から選択される一成員である。

R<sub>2</sub> 基（ここで、R<sub>2</sub> =  $-COOH$ 、PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、SO<sub>3</sub>H、NH<sub>2</sub>）を有するか、又は多価陰イオン又は多価カチオン分子、例えばスベルミン、ヘパリン等で置換される PEG を抱合することにより可能である（PEG の一般式参照）。

概して、本発明のポリエチレングリコール誘導体は、以下の一般式により示される：



Aは、塩化シアヌル、ハロゲン化シアン（BrまたはCl）及びメシル基、トシル基を含むOH-活性化剤、 $Z-C(R')=CH_2$ または $Z-CH=CH$ 〔式中、ZはCOOH、HO（アルデヒド）、H、OH（ヒドロキシル）、NH<sub>2</sub>及びSHから成る群から選択される一成員で、R'は炭素原子1～5の低級アルキル〕、 $D-C(=O)$ 〔式中、DはH、N<sub>3</sub>、OH、CH<sub>3</sub>、-NH-NH<sub>2</sub>、無水物、混合無水物または活性化エステル、たとえば、当業者に知られており、M. Bodanskyにより、「Principles of peptides synthesis:chapter II, Activation and coupling」（Haftner他、1984年、Springer-Verlag編、ニューヨーク、pp. 9～52）において定義及び例示されているもの、から成る群から選択される一成員である〕、 $Q-(CH_2)_m$ 。（式中、 $Q=1\sim7$ で $Q=-C=O$ 、N、Sで、 $O=1\sim8$ 炭素原子、好ましくは2～5の炭素原子である）から成る群から選択される一成員である。特定のOの使用は所望の特定のnEryt-PEG組成物及びその用途に依存して、熟練者により容易に適応し得る。一般にOが8よりも大きいと分子が過脂溶性になる傾向がある。

PEGをnErytに結合するのに有用な活性化基のいくつかの例を以下に示す：臭化シアヌ（BrCN）、脱アミノ酸エステル（Zalipsky et al., 1984, 「J. Macromol. Sci. Chem.」A21:8339; Mutter et al., 1979, 「The Peptides」J Gross et al., 編., 2, p.285, Academic Press, New York）、ヒドラジン誘導体（Rubinstein, 1978, 米国特許第4, 101, 380号; Davis et al., 1979, 米国特許第4, 179, 337号及びPersson et al., 1988, 「J. Chromatog.」457:183）、炭酸スクシンイミダジル誘導体（Miron et al., 1993, 「Bioconjugate Chem.」4:568; Zalipsky et al., 1993, 「Bioconjugate Chem.」4:296及びZalipsky et al., 1991, 「Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems」Dunn et al., 編., ACS, Washington, DC）、オキシカルボニルイミダゾール誘導体（Allen et al., 1991 「Biochem. Biophys. Acta」1066:29; 及びTondelli et al., 1985, 「J. Controlled Release」1:25）、炭酸ニトロフェニル誘導体（Satore et al., 1991, 「Appl. Biochem. Biotech.」27:45）、トレシレート



誘導体 (Klibanov et al., 1991, 「Biochem. Biophys. Acta」 1062:142; Delgado et al., 1990, 「Biotech. Appl. Biochem.」 12:119)、マレイミド誘導体 (Kogan, 1992, 「Synthetic Commun.」 22:2417及びRomani et al., 1984, 「Chemistry of Peptides and Proteins」 Volter et al., 編. 2. p29, Walter de Gruyter, Berlin) ;

$O(CH_2-CH_2O)_m$  はポリエチレングリコールであり (この場合、 $m = 2 \sim 500$ ) ;

$n = 1 \sim 7$  炭素原子 ;

E は、H、 $COOH$ 、 $PO_4$ 、 $SO_3H$  もしくは複素環またはWR (式中、W はO、N、S、 $-C=O$  から成る群から選択される一成員であり) から成る群から選択される一成員であり、式中、

W =  $-O-$  である場合、R は : H、1 ~ 7 個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-R''$  (ここで、 $R''$  はポリアミン誘導体、例えばスベルミン、スベルミジン又はプトレセインである) から成る群から選択される一成員であり ;

W =  $-N-$  である場合には、R は : H、1 ~ 7 個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-C(=O)-R''$  (ここで、 $R''$  はスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである)、1 個又は 2 個の  $COOH$ 、 $SO_3H$  又は  $PO_4$  基を保有する 1 ~ 6 個の炭素原子の低級アルキルから成る群から選択される一成員であり ;

W =  $-S-$  である場合、R は : H、1 ~ 7 個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-C(=O)-R''$  (ここで、 $R''$  はスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである) から成る群から選択される一成員であり ;

W =  $-C(=O)-$  である場合、R は : H、1 ~ 7 個の炭素原子を有する低級アルキル又はシクロアルキル、 $-C(=O)-R''$  (ここで、 $R''$  はスベルミン、スベルミジン又はプトレセインから得られるポリアミンである) から成る群から選択される一成員である。

前記の一般式中、Aは、多数の反応基、例えばシアヌリルクロリド誘導体、アルデヒド、スクシンイミド、ベンズイミダゾール、対称ジスルフィド、ヘテロニ官能性PEGであり、 $(CH_2CH_2O)_n$ は分子量約350～約10,000で  
 $-(CH_3)_n=CH_3$   
 である。

本開示から、「生物学的関連物質」及び「生物活性剤」とは、薬物、分子、ペプチド、タンパク質、核酸配列及び蛍光色素又はその

他の標識分子、及びPEGを包含するよう広義に用いられるが、これらに限定されない、と理解される。「PEG」という用語は、PEG誘導体を含むよう意図される、と理解される。

本発明のnErytは、生物活性剤と結合して、このような薬物のための担体を形成する。特に、小胞は生物活性剤、例えば薬物と結合して、生物活性剤が必要な身体の位置に有効に供給されるように生物活性剤の投与のための担体を提供し得る。小胞は、天然物質、生分解性、非免疫原性又は中等度の免疫原性ポテンシャルを有する、非毒性及び非発熱性、血液と完全相溶性、及び自系投与に適応性である。本明細書中及び添付の請求の範囲において、自系投与という用語は、哺乳類に投与されるナノエリスロソームが相溶性赤血球又は血液供給から得られる赤血球から調製されていた（同一哺乳類；即ち同一患者への及びそれからの投与を含む）ことを意味すると解釈されるべきである。ナノエリスロソームの非自系投与を意図する場合、nErytの免疫原性ポテンシャルを低減するのが好ましいけれども、免疫抑制又は非免疫抑制哺乳類へのその免疫反応性を低減するための処置を伴わないnErytの投与も、ある状況では意図される。

結合は、小胞の反応部位と反応する一次基、及び生物活性剤上の反応基と反応する二次基を有するカップリング剤を用いて成し遂げられる。生物活性剤をナノエリスロソームに結合する多数の方法が存在し、当業界で十分公知である。これらの例としては、十分公知の架橋試薬、例えばホモ二官能価又はヘテロ二官能価型の二官能価試薬が挙げられるが、これらに限定されない。その例を以下に示す

アジドベンゾイルヒドラジド、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシ

スクシンイミド；

N-〔4-(p-アジドサリチルアミド)ブチル〕-3'-〔2'-ピリジルジチオ〕プロピオンアミド；

p-アジドフェニル グリオキサル-水和物；

4-〔p-アジドサリチルアミド〕ブチルアミン；

1-〔p-アジドサリチルアミド〕-4-〔ヨードアセトアミド〕ブタン；

ビス-〔 $\beta$ -(4-アジドサリチルアミド)エチル〕ジスルフィド；

ビスマレイミドヘキサン；

ビス〔スルホスクシンイミジル〕スベレート；

ビス〔2-(スルホスクシンイミドオキシ)エチル〕スルホン；

ビス〔2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル〕スルホン；

#### 実施例1

血漿及びパuffyコート（白血球）の除去

哺乳類ドナー（ウマ、ウシ、ブタ、ヒト等）からの血液（2 x 30 ml）を500 × g（1500 rpm）で4℃で10分間、遠心分離した。血漿及びパuffyコートを吸引により除去した。液体を除去して、4℃で等容量のリン酸緩衝食塩水（PBS）（5 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、pH 7.4）と置き換えた。試験管を何度か逆さにして、混合物を静かに均質にした。次に、血液を500 × gで4℃で10分間、再遠心分離した。ここに記載した一連の手順を3回繰り返した。

以下のプロトコールは各々、滅菌条件下で実行した。

#### 実施例2

赤血球ゴースト低張衝撃物の調製

##### 方法2.1

実施例1に記載したように処理した血液5 mlを35 ml（50 ml Nalgen e™ 試験管中）の低張緩衝液（5 mMリン酸ナトリウム）、pH 7.4に付加し

た。赤血球懸濁液を、 $25,000 \times g$ で $4^{\circ}\text{C}$ で20分間、遠心分離した。

上清を吸引し、捨てた。除去した低張緩衝液の容量を同一容量の新鮮な緩衝液に置き換えて、懸濁液を再び遠心分離した。上清がわずかに着色するまで、この手順を3回繰り返した。ペレットを5mlのPBS緩衝液、 $\text{pH}7.4$ 中、 $4^{\circ}\text{C}$ に懸濁した。ホワイトゴースト懸濁液をプールし、20分間の遠心分離( $20,000 \times g$ )により濃縮して、必要になるまで $4^{\circ}\text{C}$ で保持した。

## 方法2. 2

実施例1で処理したような70mlの血液を、低張リン酸又は炭酸緩衝液( $2.5\text{mM}$ ) ( $2\text{mM Na}_2\text{PO}_4$ ; 氷酢酸を用いて $\text{pH}$ 調整)、 $\text{pH}10\sim11$ を用いて、セファロースCL6B (CL4Bも) 又はセファクリルS400カラム (例えば、 $10\text{cm} \times 30\text{cm}$ ) でクロマトグラフィー処理した。ホワイトゴーストを先ず収集し (死容量)、次にヘモグロビンをカラム上に保持した。酢酸を用いて $\text{pH}$ を $7.4$ とし、前記のような遠心分離によりゴーストを濃縮した。クロマトグラフィー処理により、ヘモグロビンを含有しないホワイトゴースト70mgを得た ( $1\text{mg/ml}$ の「洗浄血液」)。

## 実施例3

### ナノエリスロソーム (nEryt) の調製

#### 方法3. 1

米国特許第5,653,999号に記載されているようにして、ナノエリスロソームを調製した。約 $1\mu\text{m}$ の孔を有するポリカルボネートフィルターを通してゴーストが押し出される、ということを指摘することは重要である。ポリカルボネートフィルターは、ナノエリスロソームに粘着しないという利点を有する。ゴーストを等張懸濁液から、窒素圧下で押し出した。懸濁液は、好ましくは4回押し出される。

#### 方法3. 2

この手法は、前記の3.1とは有意に異なる。それは、より速く、且つナノエリスロソームのより良好な収率を生じるという利点を提供する。さらに、それは大規模生産により容易に利用可能である。

## 実施例6

捕獲（閉じ込め）分子を有するnErytの精製

## 方法6. 1

捕獲処理後、1mlの冷（4℃）PBS（等張、pH7.4）で3～5回希釈し、 $16,000\times g$ で8分間遠心分離して、上清を取り除き、PBSで再び希釈して、nErytを未閉じ込め分子から遊離した。

## 方法6. 2

捕獲処理後、十分公知の方法により適切なセファデックス又はセファクリルカラムを用いてサイズ排除クロマトグラフィーにより、遊離分子を遅延させ、nErytの溶離を迅速にして、未閉じ込め分子からnErytを遊離させた。捕獲（閉じ込め）物質を、適切な洗剤を用いてnErytを可溶化後に、通常の方法（閉じ込められている分子に適応）により評価した。

## 安定性

捕獲により、デキストラン-FITC-nErytの懸濁液が、4℃で保持されると少なくとも7ヶ月間安定であるという事実によって立証されたように、安定なナノエリスロソーム-生物活性剤組成物が形成された。さらに、DNAの閉じ込めを実行した。手短に言えば、PBS（ $500\mu\text{l}$ ）中に懸濁した200ngのnErytを、TKN緩衝液（リン酸塩を排除するために）で3回洗浄した。TKN緩衝液（ $10\sim 300\mu\text{l}$ ）中のDNA（ $30\sim 320\text{ng}$ ）を懸濁液に付加し、静かにホモジナイズした。懸濁液を4℃で10分間インキュベートし、液体窒素中で2分間凍結し、その後2

5℃で4分間インキュベートした。TKNM緩衝液を用いて、前記のように懸濁液を処理した。

DNアーゼ（ $0.1\text{U}/\mu\text{l}$ のDNアーゼI溶液  $100\mu\text{l}$ ）を含有する反応混合物をインキュベートして、余分のDNAを迅速に除去した。 $\text{Mg}^{2+}$ （ $10\text{mM}$ ）又は $\text{Mn}^{2+}$ （ $1\text{mM}$ ）を混合物に付加した。

DNアーゼで清浄にした後、PCRの慣用的プロトコルを用いてnEryt-DNAを増幅し、nEryt内のベクターの存在を確認した。

表 1

本明細書中に記載した技術を用いて、これらの例は、n E r y tによる捕獲の典型的結果を説明するが、これは同様の濃度の小型及び大型分子を反映する。

初期濃度 (mg/ml)	n E r y t (mg/ml)	捕獲分子 ( $\mu$ g/mgナノ)
デキストラン-4000FITC		
2.6	1.3	15.6
2.6	2.6	13.4
2.6	3.9	12.1
DNA ( $\mu$ g/ml) *		
1.3	4	0.003
13	4	0.066
65	4	0.153

\*線状(3kb)又は超螺旋DNAに関して、同様の結果が得られた。

したがって、表1は、n E r y tによる捕獲の典型的結果を説明するこれらの例を示す。これは同様の濃度の小型及び大型分子を反

映している。

#### 請求の範囲

##### 1. 式

n E r y t-A-X-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>a</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Eのナノエリスロ  
ソーム(n E r y t)-ポリエチレングリコール(PEG)抱合体であって、

式中、a) (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>a</sub>はポリエチレングリコール誘導体であって、  
mは2~500の整数、

b) nは0~7の整数、

c) Aは反応性基及び/または結合腕、

d) Xはないかまたは酸素原子、硫黄原子、-O-C(O)、-N-C(O)  
及び-S-C(O)から成る群から選択され、

e) Eは媒体相互作用基及び／または標的基である、前記抱合体。

2. 前記Aが活性化エステル基またはSH基から選択される請求項1のナノエリスロソーム-ポリエチレングリコール抱合体。

3. Aが前記PEG及び前記n E r y tの複合化を可能にする結合腕である請求項1または2のナノエリスロソーム-ポリエチレングリコール抱合体。

4. 請求項1, 2または3のナノエリスロソーム-ポリエチレングリコール抱合体であって、式中、Aは、

— シアヌリルクロリド誘導体、ハロゲン化シアン (BrまたはCl)、メシル基及びトシル基を含むOH-活性化剤、アルデヒド、スグシンイミド、スクシンイミドベンズイミダゾール、マレイミド、対称ジスルフィド及びヘテロ二官能性PEG、

—  $Z-C(R')=CH_2$ または $Z-CH=CH$ で、式中、ZはCOOH、HO (アルデヒド)、H、OH (ヒドロキシル)、NH<sub>2</sub>及びSHから成る群から選択される1成員であって、式中、R'は1~5の炭素原子の低級アルキル基、

—  $D-C(=O)-$ 、式中、DはH、N<sub>3</sub>、OH、CH<sub>3</sub>、—NH—NH<sub>2</sub>、無水物、混合無水物または活性化エステルから成る群から選択される1成員である、及び

—  $Q-(CH_2)_O$ 、式中、O=1~8で $Q=-C=O$ 、N、S、から成る群から選択される1成員である、前記抱合体。

5. 請求項1, 2, 3または4のナノエリスロソーム-ポリエチレングリコール複合体であって、Eは不活性基、正荷電した基、負荷電した基及び反応性基から成る群から選択される、前記抱合体。

6. 請求項1, 2, 3, 4または5のナノエリスロソーム-ポリエチレングリコール複合体であって、式中、Eは、

— H、COOH、PO<sub>4</sub>、SO<sub>3</sub>H及び複素環、

— WR、式中、WはO、N、S、—C(=O)から成る群から選択される1成員であり、

W=—O—のとき、

—RはH、1～7の炭素原子の低級アルキルまたはシクロアルキル、—C(=C)—R”から成る群から選択される1成員で、R”はポリアミン誘導体、たとえば、スペルミン、スペルミジンまたはプトレセインであり、

W=—N—のとき、

—RはH、1～7の炭素原子の低級アルキルまたはシクロアルキル、—C(=O)—C(=O)—R”から成る群から選択される1成員で、R”はスペルミン、スペルミジンもしくはプトレセイ

ン由来のポリアミンまたは1もしくは2のCOOH、SO<sub>3</sub>HまたはPO<sub>4</sub>基を保有する1～6の炭素原子の低級アルキル鎖、

W=—S—のとき、

—RはH、1～7の炭素原子の低級アルキルまたはシクロアルキル、—C(=O)—C(=O)—R”から成る群から選択される1成員であり、R”はスペルミン、スペルミジンまたはプトレセイン由来のポリアミンであり、

W=—C(=O)—のとき、

—RはH、1～7の炭素原子の低級アルキルまたはシクロアルキル、—O—C(=O)—R”で、R”はスペルミン、スペルミジンまたはプトレセインである、

から成る群から選択される1成員である、前記抱合体。

7. 請求項1, 2, 3, 4, 5または6のナノエリスロソーム—ポリエチレングリコール抱合体であって、Aが塩化シアヌルで、(CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>が分子量約350～約10,000を有し、—(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>—E=CH<sub>3</sub>である、前記抱合体。

8. (CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>が分子量約1,000～約7,000を有する請求項7のナノエリスロソーム—ポリエチレングリコール抱合体。

9. (CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>が分子量約2,000～約5,000を有する請求項8のナノエリスロソーム—ポリエチレングリコール抱合体。

10. 請求項1, 2, 3, 4, 5または6のナノエリスロソーム—ポリエチレン



グリコール抱合体であって、Aはシアヌリルクロリド誘導体、アルデヒド、スクシンイミド、スクシンイミドベンズイミダゾール、マレイミド、対称ジスルフィド及びヘテロ二官能性PEGから選択され、 $(CH_2-CH_2O)_n$ が分子量約350～約1

0,000を有しており、 $-(CH_2)_n-E-CH_3$ である前記抱合体。

11. 請求項1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9または10のナノエリスロソーム-ポリエチレングリコール抱合体であって、前記ナノエリスロソームが配位子に結合しており、前記配位子は前記ナノエリスロソームを前記配位子のためのレセプターに対して標的にする、前記抱合体。

12. 有意に低減した免疫ポテンシャルを有するナノエリスロソーム組成物であって、前記組成物は前記ナノエリスロソームに抱合されたPEG誘導体を含むことを特徴とする前記組成物。

13. 哺乳動物からの赤血球からのナノエリスロソームの調製に適切なホワイトゴーストを生産する方法であって、二価及び／または三価のカチオンを含まない、pH約8～約11の低張水性緩衝溶液を用いて、適切なクロマトグラフィーを含有するカラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーを含む前記方法。

14. 請求項13の方法であって、さらに、真空下、2つのフィルターを通して、前記請求項13のホワイトゴーストを濾過し、それにより、ナノエリスロソームを得、前記ナノエリスロソームを濃縮または凍結乾燥する工程を含む前記方法。

15. 式  $nEryt-H-T$  のナノエリスロソーム抱合体であって、

式中、a) Hはヘテロ官能性結合腕で、

b) Tは標的基である、前記抱合体。

16. AがSMCC及びSPDPからなる群から選択される請求項15のナノエリスロソーム抱合体。

17. 請求項15または16のナノエリスロソーム複合体であって、式中、Tは配位子で、前記配位子は前記ナノエリスロソームを前記配

位子のためのレセプターに対する標的にする、前記抱合体。

18. 請求項15, 16または17のナノエリスロソーム抱合体であって、さらに前記ナノエリスロソームを前記標的基に結合する、結合腕を含む前記抱合体。

19. 請求項15, 16, 17または18のナノエリスロソーム抱合体であって、さらに前記ナノエリスロソームに結合されるかまたはそれに関じ込められた生物活性剤を含む前記抱合体。

20. 請求項1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11または12のナノエリスロソーム-ポリエチレングリコール抱合体であって、さらに前記ナノエリスロソーム結合されるか、またはそれに関じ込められた生物活性剤を含む前記抱合体。

21. 請求項11のナノエリスロソーム-ポリエチレングリコール抱合体であって、前記配位子が抗体またはその一部分であり、前記レセプターが前記抗体またはその一部分により認識される抗原である、前記抱合体。

22. 請求項17, 18または19のナノエリスロソーム-ポリエチレングリコール抱合体であって、前記配位子は抗体またはその一部分であって、前記レセプターが前記抗体またはその一部分により認識される抗原である、前記抱合体。

23. 請求項1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21または22に記載のナノエリスロソーム抱合体といっしょに医薬として許容し得る担体を含む医薬組成物。

24. 請求項1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21または22のナノエリスロソーム抱合体の動物における病気または健康状態の防止または処置のための使用。

25. 少なくとも1つの上記ナノエリスロソーム組成物を含む診断

キット。

26. 動物における予定症状または健康状態を診断または予測するための上記ナノエリスロソーム組成物の1つを含むバイオアッセイ。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K47/48		International Application No. PCT/CA 97/00698
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	US 5 653 999 A (GAUDREAU RENE C ET AL) 5 August 1997 cited in the application see claims	1-14
A	MOORJANI M. ET AL.: "PREPARATION AND USE OF NANO-ERYTHROSOMES AS A DRUG CARRIER FOR DAUNORUBICIN" PROC. ANN. MEET. AM. ASSOC. CANCER RES., vol. 35, March 1994, page 415 XP002060694 See No 2474 see abstract	1-14
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are filed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  30 March 1998		Date of mailing of the international search report  17/04/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Berte, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's Application No.  
PCT/CA 97/00698

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 127, no. 22, 1 December 1997 Columbus, Ohio, US; abstract no. 305022, ARMSTRONG, JONATHAN K. ET AL: "Covalent binding of poly(ethylene glycol) (PEG) to the surface of red blood cells inhibits aggregation and reduces low shear blood viscosity" XP002060697 see abstract & AM. J. HEMATOL. (1997), 56(1), 26-28 CODEN: AJHEDD; ISSN: 0361-8609, 1997, .	1-14
A	V.R. MUZYKANTOV: "AVIDIN/BIOTIN-MEDIATED CONJUGATION OF ANTIBODIES TO ERYTHROCYTES: AN APPROACH FOR IN VIVO IMMUNOERYTHROCYTE EXPLORATION." BIOMETHODS, vol. 7, 1996, pages 167-182, XP002060695 see page 173 see page 176	13
P,A	A. KRANZ: "RED CELL-MEDIATED THERAPY: OPPORTUNITIES AND CHALLENGES." BLOOD CELLS, MOLECULES, AND DISEASES, vol. 23, no. 3, 15 February 1997, pages 58-68, XP002060696 see figures 4-7	1-14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/CA 97/00698

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5653999 A	05-08-97	CA 2150617 A	08-08-96

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ベルメア, フランソワ

カナダ国, ケベック ジー8ワイ 3ジー  
2, トロワールビエール, カリクサーラバ  
ル 1600